

Käesolev dokument on vaid dokumenteerimisvahend ja institutsioonid ei vastuta selle sisu eest

► **B**

KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 440/2008,

30. mai 2008,

millega kehtestatakse katsemeetodid vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH)

(EMPs kohaldatav tekst)

(ELT L 142, 31.5.2008, lk 1)

Muudetud:

		Euroopa Liidu Teataja		
		nr	lehekülg	kuupäev
► <u>M1</u>	Komisjoni määrus (EÜ) nr 761/2009, 23. juuli 2009	L 220	1	24.8.2009
► <u>M2</u>	Komisjoni määrus (EL) nr 1152/2010, 8. detsember 2010	L 324	13	9.12.2010
► <u>M3</u>	Komisjoni määrus (EL) nr 640/2012, 6. juuli 2012	L 193	1	20.7.2012
► <u>M4</u>	Komisjoni määrus (EL) nr 260/2014, 24. jaanuar 2014	L 81	1	19.3.2014
► <u>M5</u>	Komisjoni määrus (EL) nr 900/2014, 15. juuli 2014	L 247	1	21.8.2014



KOMISJONI MÄÄRUS (EÜ) nr 440/2008,

30. mai 2008,

millega kehtestatakse katsemeetodid vastavalt Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrusele (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH)

(EMPs kohaldatav tekst)

EUROOPA ÜHENDUSTE KOMISJON,

võttes arvesse Euroopa Ühenduse asutamislepingut,

võttes arvesse Euroopa Parlamendi ja nõukogu 18. detsembri 2006. aasta määrust (EÜ) nr 1907/2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ning millega asutatakse Euroopa Kemikaaliamet, muudetakse direktiivi 1999/45/EÜ ja tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 793/93 ja komisjoni määrus (EÜ) nr 1488/94 ning samuti nõukogu direktiiv 76/769/EMÜ ja komisjoni direktiivid 91/155/EMÜ, 93/67/EMÜ, 93/105/EÜ ja 2000/21/EÜ, ⁽¹⁾ eriti selle artikli 13 lõiget 3,

ning arvestades järgmist:

- (1) Määruse (EÜ) nr 1907/2006 kohaselt tuleb katsemeetodid, mida kasutatakse teabe saamiseks aine omaduste kohta, võtta vastu ühenduse tasandil.
- (2) Nõukogu 27. juuni 1967. aasta direktiivi nr 67/548/EMÜ (ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta) ⁽²⁾ V lisas on esitatud meetodid ainete ja valmististe füüsikalise-keemiliste omaduste, toksilisuse ja ökotoksilisuse määramiseks. Direktiivi 67/548/EMÜ V lisa on Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiviga 2006/121/EÜ jäetud välja alates 1. juunist 2008.
- (3) Direktiivi 67/548/EMÜ V lisas esitatud katsemeetodid tuleks võtta üle käesolevasse määrusesse.
- (4) Käesoleva määrusega ei välistata muude katsemeetodite kasutamist, kui see on kooskõlas määruse (EÜ) nr 1907/2006 artikli 13 lõikega 3.

⁽¹⁾ ELT L 396, 30.12.2006, lk 1. Parandatud väljaandes ELT L 136, 29.5.2007, lk 3.

⁽²⁾ EÜT 196, 16.8.1967, lk 1. Direktiivi on viimati muudetud Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiviga 2006/121/EÜ (ELT L 396, 30.12.2006, lk 850), parandatud väljaandes ELT L 136, 29.5.2007, lk 281.

▼B

- (5) Katsemeetodite kavandamisel tuleks võtta täielikult arvesse loomkatsete asendamise, vähendamise ja täiustamise põhimõtteid, eriti kui sobivad valideeritud meetodid loomkatsete asendamiseks, vähendamiseks ja täiustamiseks on muutunud kättesaadavaks.
- (6) Käesoleva määruse sätted on kooskõlas määruse (EÜ) nr 1907/2006 artikli 133 kohaselt asutatud komitee arvamusega,

ON VASTU VÕTNUD KÄESOLEVA MÄÄRUSE:

Artikkel 1

Määruse (EÜ) nr 1907/2006 rakendamisel kasutatavad katsemeetodid on esitatud käesoleva määruse lisas.

Artikkel 2

Komisjon vaatab käesolevas määruses esitatud katsemeetodeid vajaduse korral läbi, et asendada, vähendada ja täiustada selgroogsetega tehtavaid katseid.

Artikkel 3

Viiteid direktiivi 67/548/EMÜ V lisale tõlgendatakse viidetena käesolevale määrusele.

Artikkel 4

Käesolev määrus jõustub järgmisel päeval pärast selle avaldamist *Euroopa Liidu Teatajas*.

Käesolevat määrust kohaldatakse alates 1. juunist 2008.

▼B*LISA***A OSA: FÜÜSIKALIS-KEEMILISTE OMADUSTE MÄÄRAMISE MEETODID**

SISUKORD

- A.1. SULAMIS-/KÜLMUMISTEMPERatuur
 - A.2. KEEMISTEMPERatuur
 - A.3. SUHTELINE TIHEDUS
 - A.4. AURURÕHK
 - A.5. PINDPINEVUS
 - A.6. LAHUSTUVUS VEES
 - A.8. JAOTUSTEGUR
 - A.9. LEEKPUNKT
 - A.10. SÜTTIVUS (TAHKED AINED)
 - A.11. SÜTTIVUS (GAASID)
 - A.12. SÜTTIVUS (KOKKUPUUTEL VEEGA)
 - A.13. TAHKETE AINETE JA VEDELIKE ISESÜTTIVUS
 - A.14. PLAHVATUSOHTLIKKUS
 - A.15. ISESÜTTIMISTEMPERatuur (VEDELIKUD JA GAASID)
 - A.16. TAHKETE AINETE SUHTELINE ISESÜTTIMISTEMPERatuur
 - A.17. OKSÜDEERIVAD OMADUSED (TAHKED AINED)
 - A.18. POLÜMEERIDE ARVKESKMINE MOLEKULMASS JA MOLEKULMASSIDE JAOTUS
 - A.19. MADALAMOLEKULAARSETE AINETE SISALDUS POLÜMEERIS
 - A.20. POLÜMEERIDE LAHUSTUMIS-/EKSTRAHEERUMISKÄITUMINE VEES
 - A.21. OKSÜDEERIMISVÕIME (VEDELIKUD)
 - A.22. KIUDEDE PIKKUSE JÄRGI KAALUTUD GEOMEETRILINE KESKMINE DIAMEETER
- ▼M4**
- A.23. JAOTUSKOEFIITSIENT (SÜSTEEMIS 1-OKTANOOOL-VEESI): AEGLASE SEGAMISE MEETOD

▼B**A.1. SULAMIS-/KÜLMUMISTEMPERatuur****1. MEETOD**

Enamik kirjeldatud meetoditest põhineb OECD katsesuunis (1). Meetodite tööpõhimõtted on ära toodud viidetes 2 ja 3.

1.1. SISSEJUHATUS

Kirjeldatud meetodid ja seadmed on ette nähtud ainete sulamistemperatuuri määramiseks olenemata nende puhtusastmest.

Meetodi valik sõltub analüüsitava aine iseloomust. Määravaks teguriks on see, kas aine on kergesti või raskesti või üldse mitte peenestatav.

Mõnede ainete puhul on kohasem määrata külmumis- või tahkumistemperatuur ning meetod sisaldab ka nende määramise standardeid.

Kui aine teatavate omaduste tõttu ei ole otstarbekohane määrata ühtki eespool toodud parameetrit, võib otstarbekas olla määrata hangumistemperatuur.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Sulamistemperatuuri defineeritakse temperatuurina, mille juures aine läheb tahkest olekust vedelasse, ja ideaalis vastab see temperatuur külmumistemperatuurile.

Kuna paljude ainete puhul toimub faasisiire mingis temperatuurivahemikus, nimetatakse seda sageli sulamisvahemikuks.

Ühikute teisendamine (K °C-ks)

$$t = T - 273,15$$

t: temperatuur Celsiuse skaalal, Celsiuse kraadides (°C)

T: termodünaamiline temperatuur, kelvinites (K)

1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

Mõned kalibriained on loetletud viites 4.

▼B

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Määratakse temperatuur (temperatuurivahemik), mille juures toimub faasisiire tahkest olekust vedelasse või vedelast olekust tahkesse. Praktikas määratakse testaine proovi atmosfääriõhul kuumutamisel/-jahutamisel sulamise/külmumise alg- ja lõppfaasi temperatuurid. Kirjeldatud viit tüüpi meetodeid, nimelt kapillaatorumeetodit, kuumlaua meetodeid, külmumistemperatuuri määramisi, termoanalüüsi-meetodeid ja (naftaõlide jaoks välja töötatud) hangumistemperatuuri määramist.

Teatud juhtudel võib olla otstarbekas määrata külmumistemperatuuri asemel sulamistemperatuur.

1.4.1. **Kapillaatorumeetod**1.4.1.1. *Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks*

Väike kogus peenestatud ainet viiakse kapillaatorusse ja surutakse tihedalt kokku. Kapillaatoru kuumutatakse koos termomeetriga, reguleerides temperatuuri tõusu nii, et tegeliku sulamisprotsessi ajal tõuseb temperatuur kiirusega umbes alla 1 K/min. Määratakse sulamise alg- ja lõpptemperatuur.

1.4.1.2. *Metallplokiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks*

Põhimõttelt analoogsed punktis 1.4.1.1 kirjeldatuga, kuid kapillaatoru ja termomeeter asuvad kuumutatavas metallplokis ning on vaadeldavad plokis olevate vaatlusavade kaudu.

1.4.1.3. *Määramine fotoraku abil*

Kapillaatorus asuvat proovi kuumutatakse automaatrežiimil metallsilindris. Silindris oleva ava kaudu juhatakse läbi aine täppiskalibritud fotorakule suunatud valguskiir. Enamiku ainete optilised omadused muutuvad sulades läbipaistmatust läbipaistvaks. Fotorakuni jõudva valguse intensiivsus suureneb ja saadab kuumkambris asuva plaatina-takistustermomeetri temperatuuri digitaalnäidikule stoppsignaali. Mõnede tugeva värvusega ainete jaoks see meetod ei sobi.

1.4.2. **Kuumlauad**1.4.2.1. *Kofleri sulavuslaud*

Kofleri sulavuslaud koosneb kahest erineva soojusjuhtivusega elektriliselt kuumutatavast metallosast, kusjuures laud on valmistatud selliselt, et temperatuurigradient on kogu selle pikkuses peaaegu lineaarne. Sulavuslaua temperatuur võib varieeruda piirides 283–573 K ning sellel on spetsiaalne temperatuurinäidik antud lauale kohandatud skaala, osuti ja jooksikuga. Sulamistemperatuuri määramiseks kantakse aine õhukese kihina otse sulavuslaua pinnale. Mõne sekundi jooksul kujuneb välja terav eraldusjoon vedela ja tahke faasi vahel. Temperatuuri eraldusjoonel loetakse osuti viimisega eraldusjoonele.

▼ B1.4.2.2. *Sulavusmikroskoop*

Väga väikeste materjalikoguste sulamistemperatuuri määramisel kasutatakse mitmesuguste kuumlaudadega mikroskoobe. Enamiku kuumlaudade puhul mõõdetakse temperatuuri tundliku termopaari abil, vahel kasutatakse aga elavhõbetermomeetrit. Tüüpilises sulavusmikroskoobi kuumlaas on kuumkamber, milles olevale metallalusele asetatakse objektiklaasil olev proov. Metallaluse keskel on ava, mille kaudu siseneb mikroskoobi valguspeeglist lähtuv valgus. Kasutamise ajal suletakse kamber klaasplaadiga, mis takistab õhu juurdepääsu proovile.

Proovi kuumutamist reguleeritakse reostaadiga. Väga täpseteks mõõtmisteks optiliselt anisotroopsete ainetega võib kasutada polariseeritud valgust.

1.4.2.3. *Meniskimeetod*

Seda meetodit kasutatakse eelkõige polüamiidide puhul.

Temperatuur, mille juures kuumlaua ja polüamiid-katseobjektile toetuva katteklaasi vahele paigutatud silikoonõli menisk nihkub, määratakse visuaalselt.

1.4.3. **Külmumistemperatuuri määramise meetod**

Proov asetatakse spetsiaalsesse katseklaasi ja paigutatakse külmumistemperatuuri määramiseks seadmesse. Jahutamise ajal segatakse proovi pidevalt kergelt ja mõõdetakse sobivate vaheaegade tagant temperatuuri. Niipea, kui temperatuur paari mõõtmise kestel püsima jääb, registreeritakse see temperatuur külmumistemperatuurina (arvestades ka termomeetri viga).

Vältida tuleb allajahutamist, säilitades tahke ja vedela faasi vahel tasakaalu.

1.4.4. **Termoanalüüs**1.4.4.1 *Diferentsiaaltermoanalüüs (DTA)*

Registreeritakse ühele ja samale juhitavale temperatuuriprogrammile allutatud uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride erinevuse sõltuvus temperatuurist. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (sulamine) või eksotermilise (külmumine) kõrvalekaldena temperatuurikõvera nulljoonest.

▼B1.4.4.2 *Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria (SDK)*

Registreeritakse neelduva energia koguse sõltuvus temperatuurist ühele ja samale juhitud temperatuuriprogrammile allutatud uuritava aines ja võrdlusmaterjal. Neelduv energia kulutatakse uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride ühtlustamisele. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (sulamine) või eksotermilise (külmumine) kõrvalekaldega soojusbilansi kõvera nulljoonest.

1.4.5. **Hangumistemperatuur**

Meetod on välja töötatud naftaõlide jaoks ja sobib kasutamiseks madala sulamistemperatuuriga õlitaoliste ainete puhul.

Pärast algset kuumutamist jahutatakse proovi kindla kiirusega ja jälgitakse iga 3 K tagant selle voolavust. Madalaim temperatuur, mille juures aine liikumist täheldatakse, registreeritakse hangumistemperatuurina.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Erinevate sulamistemperatuuri/sulamisvahemiku määramise meetodite kohaldatavust ja täpsust kirjeldatakse järgmises tabelis.

TABEL: MEETODITE KOHALDATAVUS

A. Kapillaartormeetodid

Mõõtmismeetod	Peenestatavad ained	Raskesti peenestatavad ained	Temperatuurivahemik	Hinnanguline täpsus ⁽¹⁾	Olemasolev standard
Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks	jah	Ainult mõnede puhul	273–573 K	± 0,3 K	JIS K 0064
Metallplokiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks	jah	Ainult mõnede puhul	293 kuni > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Määramine foto-raku abil	jah	Lisaseadmete abil paljude puhul	253–573 K	± 0,5 K	

⁽¹⁾ Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest.



B. Kuumlauad ja külmutamismeetodid

Mõõtmismeetod	Peenestatavad ained	Raskesti peenestatavad ained	Temperatuurivahemik	Hinnanguline täpsus ⁽¹⁾	Olemasolev standard
Kofleri sulavuslaud	jah	ei	283 kuni > 573 K	± 1,0 K	ANSI/ASTM D 3451-76
Sulavusmikroskoop	jah	Ainult mõnede puhul	273 kuni > 573 K	± 0,5 K	DIN 53736
Meniskimeetod	ei	Eelkõige polüamiidide puhul	293 kuni > 573 K	± 0,5 K	ISO 1218 (E)
Külmumistemperatuuri meetodid	jah	jah	223–573 K	± 0,5 K	nt BS 4695

⁽¹⁾ Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest.

C. Termoanalüüs

Mõõtmismeetod	Peenestatavad ained	Raskesti peenestatavad ained	Temperatuurivahemik	Hinnanguline täpsus ⁽¹⁾	Olemasolev standard
Diferentsiaaltermoanalüüs	jah	jah	173 – 1 273 K	kuni 600 K ± 0,5 K kuni 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76
Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria	jah	jah	173 – 1 273 K	kuni 600K±0,5Kkuni 1 273 K ± 2,0 K	ASTM E 537-76

⁽¹⁾ Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest.

D. Hangumistemperatuur

Mõõtmismeetod	Peenestatavad ained	Raskesti peenestatavad ained	Temperatuurivahemik	Hinnanguline täpsus ⁽¹⁾	Olemasolev standard
Hangumistemperatuur	Naftaõlide ja õlitaoliste ainete jaoks	Naftaõlide ja õlitaoliste ainete jaoks	223–323 K	± 3,0 K	ASTM D 97-66

⁽¹⁾ Sõltub seadme tüübist ja toimeaine puhtusastmest.

1.6. MEETODITE KIRJELDUS

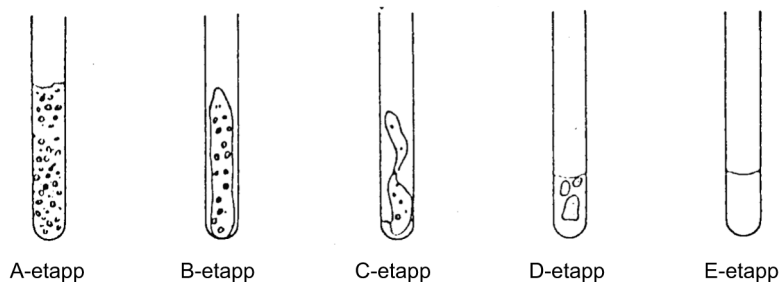
Peaaegu kõigi katsemetodite kirjeldus on ära toodud rahvusvahelistes ja siseriiklikes standardites (vt liidet 1).

1.6.1. Kapillaartorumeetodid

Temperatuuri aeglasel tõstmisel ilmnevad peenestatud ainete puhul tavaliselt joonisel 1 näidatud sulamisetapid.

▼ B

Joonis 1



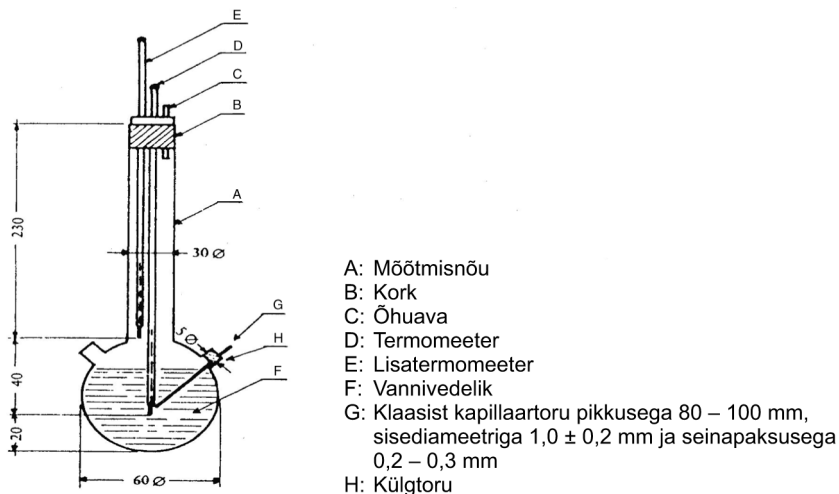
- A- etapp Sulamise algus: peened tilgakesed kinnituvad ühtlaselt kapillaartoru siseseinale.
- B- etapp Kokkutõmbumine: proov eemaldub sulava massi kokkutõmbumise tõttu siseseinast.
- C- etapp Kokkutõmbunud proov vajub kokku ja vedeldub.
- D- etapp Vedeliku pinnal kujuneb välja täielik menisk, kuid arvestatav osa proovist jääb veel tahheks.
- E- etapp Sulamise lõppfaas: tahkeid osakesi enam pole.

Sulamistemperatuuri määramisel registreeritakse temperatuur nii sulamise alg- kui ka lõppfaasis.

1.6.1.1. Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks

Joonisel 2 on näidatud standarditud klaasist sulamistemperatuuri määramise seadet (JIS K 0064); kõik mõõdud on millimeetrites.

Joonis 2



▼ B*Vedelikuvannis kuumutamisel kasutatav vedelik*

Valida tuleks sobiv vedelik. Vedeliku valik sõltub määratavast sulamistemperatuurist, nt sobib parafinõli sulamistemperatuuridele kuni 473 K, silikoonõli sulamistemperatuuridele kuni 573 K.

523 K ületavate sulamistemperatuuride puhul võib kasutada segu kolmest osast väävelhapest ja kahest osast (massisuhtes) kaaliumsulfaadist. Seesuguste segude kasutamisel tuleb rakendada kohaseid ettevaatusabinõusid.

Termomeeter

Kasutada tuleks ainult järgmiste või nendega võrdväärsede standardite nõuetele vastavaid termomeetreid:

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

Katse käik

Kuiv aine peenestatakse uhmrisk ja viiakse ühest otsast kinnisesse kapillaartorusse nii, et pärast kokkusurumist täidab aine kapillaartoru 3 mm ulatuses. Ühtlaselt tihendatud proovi saamiseks tuleks kapillaartorul lasta klaastorus umbes 700 mm kõrguselt vertikaalselt vastu kellaklaasi kukkuda.

Täidetud kapillaartoru paigutatakse vanni nii, et termomeetri elavhõbedareservuaari keskosa puutub kapillaatoruga kokku kohas, kus asub proov. Tavaliselt asetatakse kapillaartoru seadmesse temperatuuril umbes 10 K alla sulamistemperatuuri.

Vannivedelikku soojendatakse nii, et temperatuur tõuseb umbes 3 K/min. Soovitav on vedelikku segada. Umbes 10 K enne eeldatava sulamistemperatuurini jõudmist vähendatakse temperatuuri tõusu kiiruseni mitte üle 1 K/min.

Arvutamine

Sulamistemperatuur arvutatakse järgmiselt:

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

kus:

T = parandatud sulamistemperatuur (K)

T_D = termomeetri D temperatuurinäit (K)

T_E = termomeetri E temperatuurinäit (K)

n = skaalajaotuste arv termomeetri D elavhõbedasamba väljaulatuval osal

1.6.1.2. *Metallplokiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks**Seade**Koosneb:*

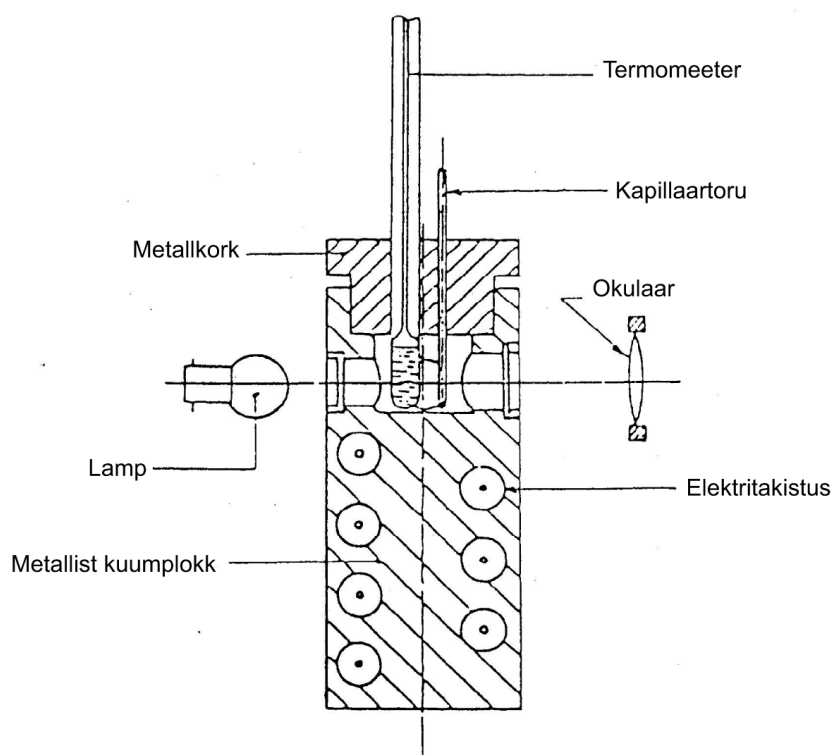
- silindrilisest metallplokist, mille ülaosa on õõnes ja moodustab kambri (vt joonist 3);
- metallkorgist ühe või kahe avaga, mis võimaldavad metallplokki torusid paigaldada;

▼B

- metallploki kütteseadmest, mis võib olla lahendatud näiteks elektritakistusena ploki;
- reostaadist võimsuse reguleerimiseks juhul, kui kasutatakse elektrilist kütteseadet;
- neljast üksteise suhtes täisnurga all paiknevast kuumuskindla klaasiga aknast kambri külgsentel. Ühe sellise akna ette on paigaldatud okulaar kapillaartoru jälgimiseks. Kolme ülejäänud akent kasutatakse sisemuse valgustamiseks lampide abil;
- ühest otsast kinnisest kuumuskindlast klaasist kapillaartorust (vt 1.6.1.1).

Vt punktis 1.6.1.1 nimetatud standardeid. Sobivad ka võrreldava täpsusega termoelektrilised mõtteseadmed.

Joonis 3



1.6.1.3. Määramine fotoraku abil

Seade ja katse käik

Seade koosneb automaatse küttesüsteemiga metallkambrist. Kolm kapillaartoru täidetakse vastavalt punktile 1.6.1.1 ja paigutatakse ahju.

▼B

Seadme kalibreerimiseks on võimalik kasutada mitmesuguseid lineaarseid temperatuuritõuse; sobivat temperatuuritõusu reguleeritakse elektriliselt vastavalt seadistatud konstantssele lineaarsele tõusukiirusele. Meerikud näitavad ahju tegelikku temperatuuri ja kapillaartorus oleva aine temperatuuri.

1.6.2. **Kuumlauad**

1.6.2.1. *Kofleri sulavuslaud*

Vt liidet.

1.6.2.2. *Sulavusmikroskoop*

Vt liidet.

1.6.2.3. *Meniskimeetod (polüamiididele)*

Vt liidet.

Sulamistemperatuuri vahemikus ei tohiks temperatuur tõusta kiiremini kui 1 K/min.

1.6.3. **Külmumistemperatuuri määramise meetodid**

Vt liidet.

1.6.4. **Termoanalüüs**

1.6.4.1. *Diferentsiaaltermoanalüüs*

Vt liidet.

1.6.4.2. *Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria*

Vt liidet.

1.6.5. **Hangumistemperatuuri määramine**

Vt liidet.

2. **ANDMED**

Mõningatel juhtudel on termomeetri näitusid vaja korrigeerida.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— kasutatud meetodit;

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmed ja lisandid) ja eelneva puhastusetapi kirjeldust (kui seda on rakendatud);

— hinnangulist täpsust.

Sulamistemperatuurina registreeritakse vähemalt kahe hinnangulise täpsuse piiridesse (vt tabelleid) jääva mõõtetulemuse keskmine.

▼B

Kui sulamise alg- ja lõppfaasi temperatuuride vahe jääb meetodi hinnangulise täpsuse piiridesse, registreeritakse sulamistemperatuurina sulamise lõppfaasi temperatuur; vastasel juhul registreeritakse mõlemad väärtused.

Kui aine enne sulamistemperatuurini jõudmist laguneb või sublimeerub, registreeritakse temperatuur, mille juures see aset leiab.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

4. VIITED

1. OECD, Paris, 1981, Test Guideline 102, Decision of the Council C(81) 30 final.
2. IUPAC, B. Le Neindre, B. Vodar, eds. Experimental thermodynamics, Butterworths, London 1975, vol. II, 803-834.
3. R. Weissberger ed.: Technique of organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York, 1959, vol. I, Part I, Chapter VII.
4. IUPAC, Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from national laboratories, Pure and applied chemistry, 1976, vol. 48, 505-515.

▼B*Liide*

Täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks võib näidetena tutvuda järgmiste standarditega.

1. **Kapillaartoru meetodid**
 - 1.1. Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks

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 Kapillarverfahren
JIS K 00-64	Testing methods for melting point of chemical products
 - 1.2. Metallplokiga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
ISO 1218 (E)	Plastics – polyamides – determination of „melting point”
2. **Kuumlauad**
 - 2.1. Kofleri sulavuslaud

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

DIN 53736	Visuelle Bestimmung der Schmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
-----------	---
 - 2.3. Meniskimeetod (polüamiididele)

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” Methode du ménisque

3. **Külmumistemperatuuri määramise meetodid**

BS 4633 Method for the determination of crystallizing point

BS 4695 Method for Determination of Melting Point of petroleum wax (Cooling Curve)

DIN 51421 Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen

ISO 2207 Cires de pétrole: détermination de la température de figeage

DIN 53175 Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren

NF T 60-114 Point de fusion des paraffines

NF T 20-051 Méthode de détermination du point de cristallisation (point de congélation)

ISO 1392 Method for the determination of the freezing point

4. **Termoanalüüs**

4.1. Diferentsiaaltermoanalüüs

ASTM E 537-76 Standard method for asseying 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 Thermisches Analyse, Begriffe

4.2. Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria

ASTM E 537-76 Standard method for asseying 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 Thermisches Analyse, Begriffe

5. **Hangumistemperatuuri määramine**

NBN 52014 Echantillonnage et analyse des produits du pétrole: Point de trouble et point d'écoulement limite – Monsterneming en ontleding van aardolie-producten: 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. KEEMISTEMPERATUUR****1. MEETOD**

Enamik kirjeldatud meetoditest põhineb OECD katsesuunis (1). Meetodite tööpõhimõtted on ära toodud viidetes 2 ja 3.

1.1. SISSEJUHATUS

Siin kirjeldatud meetodeid ja seadmeid saab kasutada vedelate ja madala sulamistemperatuuriga ainete korral eeldusel, et nendega ei toimu allpool keemistemperatuuri mingeid keemilisi reaktsioone (näiteks autooksüdatsiooni, ümberasetust, lagunemist jne). Meetodid sobivad kohaldamiseks nii puhastele kui ka lisanditega vedelikele.

Põhirõhk on pandud fotorakk-detektorit või termoanalüüsi kasutavatele meetoditele, kuna need sobivad nii sulamis- kui ka keemistemperatuuri määramiseks. Lisaks on mõõtmised automatiseeritavad.

„Dünaamilise meetodi” eelis on sobivus ka aururõhu määramiseks ning puudub vajadus parandada keemistemperatuuri normaalrõhule (101,325 kPa), kuna rõhku on mõõtmise käigus võimalik manostaadi abil normaalrõhule reguleerida.

Märkused

Lisandite mõju keemistemperatuuri määramisele sõltub olulisel määral lisandi iseloomust. Kui proov sisaldab tulemust mõjutada võivaid lenduvaid lisandeid, võib seda puhastada.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Keemistemperatuur normaalrõhul defineeritakse temperatuurina, mille juures vedeliku aururõhk on 101,325 kPa.

Kui keemistemperatuuri ei määrata normaalrõhul, kirjeldab aururõhu sõltuvust temperatuurist Clausiuse-Clapeyroni võrrand:

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

kus:

P = aine aururõhk paskalites

ΔH_v = aine aurustumissoojus (J mol⁻¹)

R = universaalne gaasikonstant = 8,314 (J mol⁻¹ K⁻¹)

T = termodünaamiline temperatuur (K)

Keemistemperatuur registreeritakse mõõtmisaegse õhurõhu suhtes.

▼ B*Teisendused*

Rõhk (ühikud: kPa)

100 kPa = 1bar = 0,1 MPa

(ühik „bar” on lubatud, kuid ei ole soovitatav)

133 Pa = 1mm Hg=1 Torr

(ühikud „mm Hg” ja „Torr” ei ole lubatud)

1 atm = normaalatmosfäär = 101 325 Pa

(ühik „atm” ei ole lubatud)

Temperatuur (ühikud: K)

$t = T - 273,15$

t: temperatuur Celsiuse skaalal, Celsiuse kraadides (°C)

T: termodünaamiline temperatuur, kelvinites (K)

1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

Mõned kaliibrimisained on ära toodud liites loetletud meetodites.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Viis meetodit keemistemperatuuri (keemistemperatuuri vahemiku) määramiseks põhinevad keemistemperatuuri mõõtmisel, ülejäänud kaks termoanalüüsil.

1.4.1. Määramine ebulliomeetri abil

Ebulliomeetrid töötati algselt välja molaarmassi määramiseks keemistemperatuuri tõusu järgi, kuid nad sobivad ka keemistemperatuuri täpseks mõõtmiseks. Väga lihtsat seadet kirjeldatakse ASTM D 1120-72 (vt liidet). Selles seadmes kuumutatakse vedelikku atmosfäärirõhul tasakaalutingimustes kuni keemiseni.

1.4.2. Dünaamiline meetod

Selle meetodi kohaselt mõõdetakse keemise ajal tagasijooksus sobiva termomeetri abil auru kondensatsioonitemperatuur. Meetod võimaldab rõhku varieerida.

1.4.3. Destillatsioonimeetod keemistemperatuuri määramiseks

Selle meetodi kohaselt mõõdetakse vedeliku destillatsioonil auru kondensatsioonitemperatuur ja destillaadi kogus.

▼ B**1.4.4. Siwoloboffi meetod**

Proovi kuumutatakse katseklaasis vedelikuvannil. Katseklaasi paigutatakse alt kinni joodetud kapillaartoru, mille alumises osas on õhumull.

1.4.5. Määramine fotoraku abil

Mõõtmine tehakse eralduvate mullide põhjal automaatselt ja fotoelektriliselt, järgides Siwoloboffi meetodit.

1.4.6. Diferentsiaaltermoanalüüs

Registreeritakse ühele ja samale juhitud temperatuuriprogrammidele allutatud uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride erinevuse sõltuvus temperatuurist. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (keemine) kõrvalekaldena temperatuurikõvera nulljoonest.

1.4.7. Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria

Registreeritakse neelduva energia koguse sõltuvus temperatuurist ühele ja samale juhitud temperatuuriprogrammidele allutatud uuritavas aines ja võrdlusmaterjalis. Neelduv energia kulutatakse uuritava aine ja võrdlusmaterjali temperatuuride ühtlustamiseks. Kui proovis toimub entalpia muutusega seotud üleminek, väljendub see endotermilise (keemine) kõrvalekaldena soojusbilansi kõvera nulljoonest.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Erinevate keemistemperatuuri/keemistemperatuuri vahemiku määramise meetodite kohaldatavust ja täpsust kirjeldatakse tabelis 1.

Tabel 1.

Meetodite võrdlus

Mõõtmismeetod	Hinnanguline täpsus	Olemasolev standard
Ebulliomeeter	± 1,4 K (kuni 373 K) ⁽¹⁾ , ⁽²⁾ ± 2,5 K (kuni 600 K) ⁽¹⁾ , ⁽²⁾	ASTM D 1120-72 ⁽¹⁾
Dünaamiline meetod	± 0,5 K (kuni 600 K) ⁽²⁾	
Destillatsioonimeetod (keemistemperatuuri vahemik)	± 0,5 K (kuni 600 K)	ISO/R 918, DIN 53171, BS 4591/71
Siwoloboffi meetod	± 2 K (kuni 600 K) ⁽²⁾	
Määramine fotoraku abil	± 0,3 K (373 K juures) ⁽²⁾	
Diferentsiaaltermoanalüüs	± 0,5 K (kuni 600 K) ± 2,0 K (kuni 1 273 K)	ASTM E 537-76
Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria	± 0,5 K (kuni 600 K) ± 2,0 K (kuni 1 273 K)	ASTM E 537-76

⁽¹⁾ See täpsus kehtib ainult lihtsa, näiteks ASTM D 1120-72 kirjeldusele vastava seadme puhul; keerukamate ebulliomeetrite abil on täpsust võimalik suurendada.

⁽²⁾ Kehtib ainult puhaste ainete puhul. Muudel juhtudel kasutamist tuleb põhjendada.

▼B

1.6. MEETODITE KIRJELDUS

Osade katsemeetodite kirjeldus on ära toodud rahvusvahelistes ja siseriiklikes standardites (vt liidet).

1.6.1. **Ebulliomeeter**

Vt liidet.

1.6.2. **Dünaamiline meetod**

Vt katsemeetodit A.4 aururõhu määramiseks.

Registreeritakse 101 325 kPa avaldatavale rõhule vastav keemistemperatuur.

1.6.3. **Destillatsioonimeetod (keemistemperatuuri vahemik)**

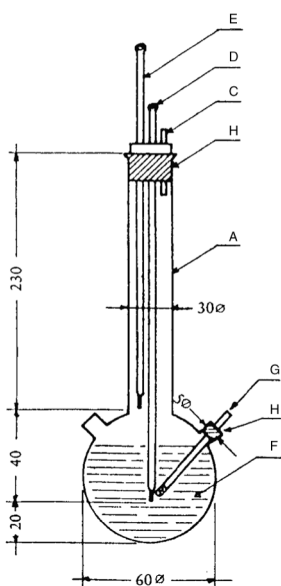
Vt liidet.

1.6.4. **Siwolobffi meetod**

Ligikaudu 5 mm läbimõõduga katseklaasis olevat proovi kuumutatakse sulamistemperatuuri määramise seadmes (joonis 1).

Joonisel 1 on näidatud standarditud klaasist sulamis- ja keemistemperatuuri määramise seade (JIS K 0064) (kõik mõõdud on millimeetrites).

Joonis 1

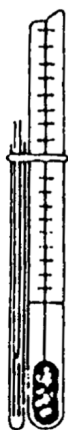


- A: Mõõtmisnõu
- B: Kork
- C: Öhuava
- D: Termomeeter
- E: Lisatermomeeter
- F: Vannivedelik
- G: Kuni 5 mm välisdiameetriga katseklaas, mille sees on ligikaudu 100 mm pikkune, ligikaudu 1 mm sisediameetri ja ligikaudu 0,2-0,3 mm seinapaksusega kapillaartoru
- H: Külgtoru

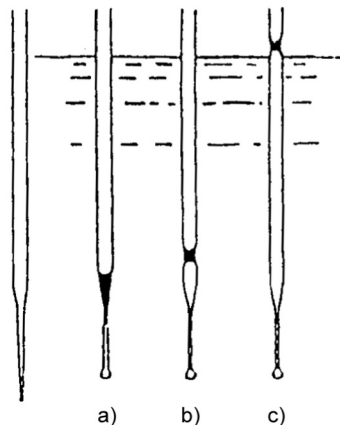
Katseklaasi paigutatakse alumisest otsast ligikaudu 1 cm kauguselt kinni joodetud kapillaartoru (keedukapillaar). Lisatava testaine kogus valitakse selline, et kapillaartoru kinnijoodetud osa jääb allapoole vedeliku pinda. Keedukapillaariga katseklaas seotakse kas kummi-paelaga termomeetri külge või kinnitatakse külgtõega (vt joonist 2).

▼B

Joonis 2

Siwoloboffi meetod

Joonis 3

Muudetud meetod

Vedelikuvannis kuumutamisel kasutatav vedelik valitakse keemistemperatuuri järgi. Temperatuuridel kuni 573 K võib kasutada siliikoonõli. Parafiinõli võib kasutada maksimaalselt temperatuurini 473 K. Vannivedelikku soojendatakse nii, et temperatuur tõuseb umbes 3 K/min. Vannivedelikku tuleb segada. Umbes 10 K enne eeldatava keemistemperatuurini jõudmist vähendatakse soojendamist nii, et temperatuur tõuseb kiirusega alla 1 K/min. Keemistemperatuuri lähenedes hakkab keedukapillaarist kiiresti mulle eralduma.

Keemistemperatuur on selline temperatuur, mille juures mullide voog kiirel jahutamisel katkeb ning vedelikunivoo kapillaartorus hakkab järsult tõusma. Termomeetri vastav näit ongi aine keemistemperatuur.

Muudetud meetodi (joonis 3) kohaselt määratakse keemistemperatuur sulamistemperatuuri määramisel kasutatavas kapillaartorus. Selle ots tõmmatakse umbes 2 cm pikkuses peeneks (a) ja kapillaartorusse imetakse väike kogus proovi. Kapillaartoru avatud ots joodetakse kinni, nii et tippu jääb väike õhumull. Kuumutamisel sulamistemperatuuri määramise seadmes (b) õhumull paisub. Keemistemperatuur vastab temperatuurile, mille juures ainekork tõuseb vannivedeliku pinna tasemeni (c).

1.6.5. Määramine fotoraku abil

Kapillaartorus olevat proovi kuumutatakse soojendatavas metallplokis.

Plokis olevate vastavate avade kaudu juhitakse läbi aine täppskalibreeritud fotorakule suunatud valguskiir.

Proovi temperatuuri tõusmisel hakkab keedukapillaarist üksikuid mulle eralduma. Keemistemperatuurile lähenedes kasvab eralduvate mullide arv märgatavalt. Selle tulemusel fotorakus registreeritava valguse intensiivsus suureneb ja saadab plokis asuva plaatinatakistustermomeetri temperatuuri näidikule stoppsignaali.

Meetod on väga mugav, kuna võimaldab ilma seadet muutmata mõõta keemistemperatuuri ka allpool toatemperatuuri kuni 253,15 K (−20 °C). Selleks tuleb seade lihtsalt jahutusvanni paigutada.

▼ B1.6.6. **Termoanalüüs**1.6.6.1. *Diferentsiaaltermoanalüüs*

Vt liidet.

1.6.6.2. *Skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria*

Vt liidet.

2. **ANDMED**

Väikestel lahkevustel normaalarõhust (kuni ± 5 kPa) normaliseeritakse keemistemperatuuri väärtused keemistemperatuurile normaalarõhul (T_n) järgmise Sidney Youngi arväärtus-võrrandi abil:

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

kus:

$$\Delta p = (101,325 - p) \text{ (vt märki)}$$

$$p = \text{mõõdetud rõhk (kPa)}$$

$$f_T = \text{keemistemperatuuri muutuse sõltuvus rõhust (K/kPa)}$$

$$T = \text{mõõdetud keemistemperatuur (K)}$$

$$T_n = \text{normaalarõhule parandatud keemistemperatuur (K)}$$

Paljude ainete temperatuuriparandustegurid (f_T) ning valemid nende ligikaudseks arvutamiseks on ära toodud eespool nimetatud rahvusvahelistes ja siseriiklikes standardites.

Näiteks toob DIN 53171 ära järgmised ligikaudsed parandustegurid värvides kasutatavatele lahustitele:

Tabel 2.

Temperatuuriparandustegurid f_T

Temperatuur T (K)	Parandustegur 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	0,4
548,15	0,45
573,15	0,47

▼B3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- kasutatud meetodit;
- aine täpset kirjeldust (tunnusandmed ja lisandid) ja eelneva puhastusetaapi kirjeldust (kui seda on rakendatud);
- hinnangulist täpsust.

Keemistemperatuurina registreeritakse vähemalt kahe hinnangulise täpsuse piiridesse (vt tabel 1) jääva mõõdetulemuse keskmine.

Ära tuuakse nii mõõdetud keemistemperatuurid kui ka nende keskmine; rõhud, mille juures mõõtmised tehti, registreeritakse kilopaskalites (kPa). Eelistatavalt peaks rõhk olema lähedane normaalrõhule.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

4. **VIITED**

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*Liide*

Täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks võib näidetena tutvuda järgmiste standarditega.

1. **Ebulliomeeter**
 - 1.1. Vedelikuvanniga seadmed sulamistemperatuuri määramiseks

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

2. **Destillatsioonimeetod (keemistemperatuuri vahemik)**

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

3. **Diferentsiaaltermoanalüüs ja skaneeriv diferentsiaalkalorimeetria**

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. SUHTELINE TIHEDUS****1. MEETOD**

Kirjeldatud meetodid põhinevad OECD katsesuunis (1). Meetodite tööpõhimõte on ära toodud viites (2).

1.1. SISSEJUHATUS

Kirjeldatud suhtelise tiheduse määramise meetodid sobivad kohaldamiseks nii tahketele kui vedelatele ainetele, olenemata nende puhtusastmest. Tabelis 1 on ära toodud mitmesugused meetodid.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Tahkete ainete ja vedelike suhteline tihedus D_{4}^{20} on 20 °C juures määratud kindla mahuga aine massi ja 4 °C juures määratud sama mahuga veekoguse massi suhe. Suhtelisel tihedusel puudub ühik.

Aine tihedus (ρ) on tema massi (m) ja mahu (v) suhe.

Tihedus (ρ) esitatakse SI-ühikutes (kg/m^3).

1.3. VÕRDLUSAINED (1, 3)

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Kasutatakse nelja tüüpi meetodeid.

1.4.1. Ujuvusmeetodid**1.4.1.1. Hüdroomeeter (vedelike jaoks)**

Küllalt täpselt ja kiiresti saab tihedust määrata ujukhüdromeetrite abil, mille skaalajaotised võimaldavad vedeliku tiheduse määrata sukeldunud osa pikkuse põhjal.

1.4.1.2. Hüdrostaatilisid kaalud (vedelike ja tahkete ainete jaoks)

Proovi tihedust on võimalik määrata selle õhus ja sobivas vedelikus (nt vees) mõõdetud masside vahe põhjal.

Tahkete ainete puhul iseloomustab leitud tihedus ainult konkreetset proovi. Vedelike tiheduse määramiseks kaalutakse teadaoleva ruumalaga (v) keha kõigepealt õhus ja siis vedelikus.

1.4.1.3. Sukeldatud keha meetod (vedelike jaoks) (4)

Selle meetodi kohaselt määratakse vedeliku tihedus vedeliku kaalumisel enne ja pärast teadaoleva ruumalaga keha sukeldamist uuritavasse vedelikku saadud masside vahe põhjal.

▼B**1.4.2. Püknomeetrit rakendavad meetodid**

Meetodid sobivad nii tahketele ainetele kui ka vedelikele, võimalik on kasutada erineva kujuga ja kindla ruumalaga püknomeetreid. Tihedus arvutatakse täis ja tühja püknomeetri masside vahe ja püknomeetri teadaoleva ruumala põhjal.

1.4.3. Õhkvõrdluspüknomeeter (tahkete ainete jaoks)

Gaasvõrdluspüknomeetri abil on toatemperatuuril võimalik määrata mis tahes kujul oleva tahke aine tihedust. Aine ruumala mõõdetakse õhu või inertgaasiga täidetud muutuva kaliibritud mahuga silindris. Tiheduse arvutamiseks määratakse pärast ruumala mõõtmist aine mass.

1.4.4. Resonantstihedusmõõtur (5, 6, 7)

Vedeliku tihedust on võimalik määrata resonantstihedusmõõturi abil. U-toruna konstrueeritud mehaaniline ostsillaator pannakse vibreerima ostsillaatori massist sõltuval resonantssagedusel. Proovi viimine U-torru muudab ostsillaatori resonantssagedust. Seade tuleb kaliibrida kahe vedelikuga, mille tihedus on teada. Vedelike valimisel tuleks eelistada selliseid, mille tihedused hõlmavad mõõdetavat vahemikku.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Erinevate suhtelise tiheduse määramise meetodite kohaldatavust kirjeldatakse allpool olevas tabelis.

1.6. MEETODITE KIRJELDUS

Liites on täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks esitatud näidetena standardeid.

Katsed tuleb läbi viia 20 °C juures ja teha tuleb vähemalt kaks mõõtmist.

2. ANDMED

Vt standardeid.

3. ARUANDLUS

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— kasutatud meetodit;

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmed ja lisandid) ja eelneva puhastusetaapi kirjeldust (kui seda on rakendatud).

Suhteline tihedus D_4^{20} registreeritakse vastavalt punkti 1.2 definitsioonile koos analüüsitava aine füüsikalise olekuga.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmed ja märkused.



Tabel.

Meetodite rakendatavus

Mõõtmismeetod	Tihedus		Maksimaalne võimalik dünaamiline viskoossus	Olemasolevad standardid
	tahke aine	vedelik		
1.4.1.1. Hüdroomeeter		jah	5 Pa·s	ISO 387 ISO 649-2 NF T 20-050
1.4.1.2. Hüdrostaatilised kaalud				
a) tahked ained	jah			ISO 1183 (A)
b) vedelikud		jah	5 Pa·s	ISO 901 ja 758
1.4.1.3. Sukeldatud keha meetod		jah	20 Pa·s	DIN 53217
1.4.2. Püknomeeter				ISO 3507
a) tahked ained	jah			ISO1183(B) NF T 20-053
b) vedelikud		jah	500 Pa·s	ISO 758
1.4.3. Õhkvõrdluspüknomeeter	jah			DIN 55990 Teil 3, DIN 53243
1.4.4. Resonantstihedusmõõtur		jah	5 Pa·s	

4.

VIITED

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*Liide*

Täiendavate tehniliste üksikasjadega tutvumiseks võib näidetena tutvuda järgmiste standarditega.

1. **Ujuvusmeetodid**

1.1. Hüdromeeter

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

1.2. Hüdrostaatilised kaalud

Tahkete ainete jaoks

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

Vedelike jaoks

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 ja 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. Sukeldatud keha meetod

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

2. **Püknomeetrit rakendavad meetodid**

2.1. Vedelike jaoks

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 m² 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 m² s⁻¹ at 20 °C, applicable in particular also to hydrocarbons and aqueous solutions as well as to liquids with higher vapour pressure, approximately 1 bar at 90 °C)

▼ B

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

▼B

2.2. Tahkete ainete jaoks

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. **Õhkvõrdluspüknomeeter**

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

▼ **M1****A.4. AURURÕHK****1. METOODIKA**

Käesolev meetoodika on samaväärne standardiga OECD TG 104 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolevas meetoodika A.4(1) uuesti läbi vaadatud versioonis on esitatud üks täiendav mõõtemetod, „Efusioonmeetod: isothermiline termogravimeetria”; see on välja töötatud väga madala aururõhuga (kuni 10^{-10} Pa) ainete jaoks. Arvestades vajadust meetodite järele, mis võimaldavad mõõta eeskätt madala aururõhuga ainete aururõhku, on ümber hinnatud ka käesoleva meetoodika muude mõõtemetodite rakenduspiirid.

Termodünaamilise tasakaalu tingimustes sõltub puhta aine aururõhk ainult temperatuurist. Asjaomased põhimõtted on esitatud mujal (2, 3).

Ükski mõõtmismeetod ei ole rakendatav kogu aururõhkude vahemikus – vähem kui 10^{-10} Pa kuni 10^5 Pa. Sellepärast esitatakse käesolevas kirjelduses kaheksa aururõhu mõõtmise meetodit, mis on rakendatavad erinevates aururõhu vahemikes. Tabelis 1 on võrreldud nende meetodite rakendatavust ja mõõtevahemikke. Neid meetodeid saab kasutada üksnes ainete puhul, mis mõõtmistingimustes ei lagune. Juhul kui tehnilistel põhjustel eksperimentaalseid meetodeid ei saa kasutada, võib aururõhku ka hinnata; soovitatav hindamismeetod on esitatud liites.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Aine aururõhk on tema küllastatud auru rõhk vedelas või tahkes faasis oleva aine kohal.

Tuleb kasutada rahvusvahelise mõõtühikute süsteemi (SI) rõhuühikut, milleks on paskal (Pa). Varem kasutusel olnud rõhuühikud ja nende teisendustegurid on järgmised:

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

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

$$1 \text{ baar} = 10^5 \text{ Pa}$$

SI temperatuuriühik on kelvin (K). Celsiuse kraadid teisendatakse kelviniteks järgmise valemi abil:

$$T = t + 273,15$$

kus T on kelvinites väljendatud termodünaamiline temperatuur ja t on temperatuur Celsiuse kraadides.



Tabel 1

Mõõtmismeetod	Aine		Hinnanguline korratavus	Hinnanguline reprodutseeritavus	Soovitatav mõõtevahemik
	Tahke	Vedelik			
Dünaamiline meetod	Kergsulav	Jah	kuni 25 % 1–5 %	kuni 25 % 1–5 %	10 ³ Pa kuni 2 × 10 ³ Pa, 2 × 10 ³ Pa kuni 10 ⁵ Pa
Staatiline meetod	Jah	Jah	5–10 %	5–10 %	10 Pa kuni 10 ⁵ Pa, 10 ⁻² Pa kuni 10 ⁵ Pa ⁽¹⁾
Isoteniskoopiline meetod	Jah	Jah	5–10 %	5–10 %	10 ² Pa kuni 10 ⁵ Pa
Efusioonmeetod: aururõhukaalud	Jah	Jah	5–20 %	kuni 50 %	10 ⁻³ kuni 1 Pa
Efusioonmeetod: Knudseni rakk	Jah	Jah	10–30 %	—	10 ⁻¹⁰ kuni 1 Pa
Efusioonmeetod: isotermiline termogravimeetria	Jah	Jah	5–30 %	kuni 50 %	10 ⁻¹⁰ kuni 1 Pa
Gaasiküllastusmeetod	Jah	Jah	10–30 %	kuni 50 %	10 ⁻¹⁰ kuni 10 ³ Pa
Pöörleva kuuli meetod	Jah	Jah	10–20 %	—	10 ⁻⁴ kuni 0,5 Pa

⁽¹⁾ Mahtvusmanomeetri kasutamise korral.

1.3. MÕÕTMISE PÕHIMÕTE

Üldiselt määratakse aururõhku erinevatel temperatuuridel. Kitsas temperatuurivahemikus sõltub puhta aine aururõhu logaritm lineaarselt termodünaamilisest temperatuurist vastavalt lihtsustatud Clapeyron-Clausiusi võrrandile:

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

kus:

p = aururõhk, Pa,

ΔH_v = aurustumissoojus, Jmol⁻¹,

R = universaalne gaasikonstant, 8,314 Jmol⁻¹K⁻¹,

T = temperatuur, K.

▼ **M1**

1.4. STANDARDAINED

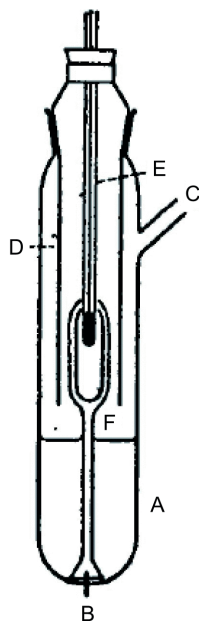
Standardained ei ole tingimata vaja kasutada. Neid on vaja eeskätt selleks, et aeg-ajalt kontrollida meetodi suutlikkust ja võrrelda eri meetodite abil saadud tulemusi.

1.5. MEETODITE KIRJELDUS

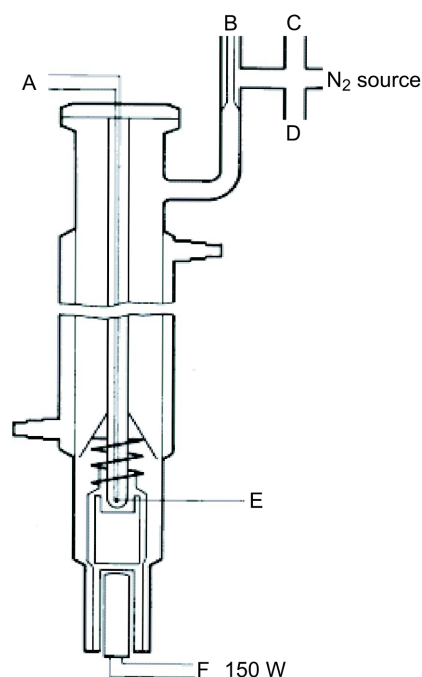
1.5.1. **Dünaamiline meetod (Cottrelli meetod)**1.5.1.1. *Põhimõte*

Aururõhu määramiseks mõõdetakse aine keemistemperatuur erinevatel teadaolevatel rõhkudel ligikaudu 10^3 – 10^5 Pa vahemikus. Seda meetodit soovitatakse ka keemistemperatuuri määramiseks. Selleks saab kõnesolevat meetodit kasutada kuni temperatuurini 600 K. Vedelikusamba hüdrostaatilise rõhu tõttu on vedeliku keemistemperatuur 3–4 cm sügavusel ligikaudu $0,1$ °C kõrgem kui vedeliku pinnal. Cottrelli meetodi (4) puhul asetatakse termomeeter aurudesse vedeliku pinna kohal ja keeval vedelikul lastakse pidevalt voolata üle termomeetri reservuaari. Termomeetri reservuaar on pidevalt kaetud õhukese vedelikukihiga, mis on tasakaalus atmosfäärirõhul oleva auruga. Seega vastab termomeetri näit tõelisele keemistemperatuurile, kusjuures mõõtmistulemus ei sisalda ülekuumenemisest või hüdrostaatilisest rõhust tingitud viga. Cottrelli poolt algselt kasutatud pump on kujutatud joonisel 1. Katseklaasis A on keev vedelik. Põhja külge joodetud plaatinatraat soodustab ühtlast keemist. Külgtoru C on ühendatud püstjahutiga; pritsmekaitse D ei lase termomeetril E puutuda kokku külma kondensaadiga. Kui vedelik katseklaasis A keeb, tõusevad lehrisse sattunud mullid ja vedelik üles ning suunatakse pumba F kahte haru pidi termomeetri reservuaarile.

Joonis 1



Joonis 2



▼ **M1**

Cottrelli pump (4)

A: termopaar

B: anum vaakumi stabiliseerimiseks

C: manomeeter

D: vaakumpump

E: mõõtmispunkt

F: kütteelement, ligikaudu 150 W

1.5.1.2. *Mõõteseade*

Joonisel 2 on kujutatud suurt täpsust võimaldav mõõteseade, milles on kasutatud Cottrelli põhimõtet. See kujutab endast toru, mille alumises osas keeb vedelik, keskmine osa kujutab endast jahutit ning ülemises osas on väljumisava ja äärik. Cottrelli pump asub keemisseksioonis, mida kütab elektriline padrunkuumuti. Temperatuuri mõõdetakse kaetud termopaari või takistustermomeetri abil, mis on viidud torusse ülevalt läbi äärikliite. Väljumisava on ühendatud rõhu reguleerimise süsteemiga. See hõlmab vaakumpumpa, anumad vaakumi stabiliseerimiseks, manostaati, millest lastakse seadmesse rõhu reguleerimiseks vajalikku lämmastikku, ja manomeetrit.

1.5.1.3. *Mõõtmise käik*

Aine viiakse keemisseksiooni. Kui tahke aine ei ole pulbri kujul, võib seejuures esineda raskusi, mille puhul mõnikord aitab jahutus-särge kuumutamise. Seade suletakse äärikliitega ja ainest eemaldatakse gaasid. Vahutavate ainete aururõhku ei saa selle meetodiga mõõta.

Seade reguleeritakse kõige madalamale vajalikule rõhule ja lülitatakse sisse kütte. Samal ajal ühendatakse temperatuuriandur registreerimiseseadmega.

Kui püsival rõhul registreeritakse püsiv keemistemperatuur, on saavutatud tasakaal. Eriti tuleb jälgida, et keemine ei oleks tõukeline. Lisaks sellele peab jälgima, et kondenseerumine jahutis oleks täielik. Kui määratakse kergsulava tahke aine aururõhku, tuleb jälgida, et jahuti ei ummistuks.

Pärast tasakaalupunkti registreerimist reguleeritakse seade kõrgemale rõhule. Mõõtmisi jätkatakse samal viisil, kuni saavutatakse rõhk 10^5 Pa (aururõhk mõõdetakse kokku ligikaudu 5–10 tasakaalupunktis). Kontrolliks kordatakse mõõtmist tasakaalupunktides alaneva rõhu järjekorras.

1.5.2. **Staatiline meetod**

1.5.2.1. *Põhimõte*

Staatilise meetodi (5) puhul määratakse termodünaamilise tasakaalule vastav aururõhk kindlaksmääratud temperatuuril. See meetod sobib individuaalsete ainete ning mitmekomponendiliste vedelike ja tahkete ainete segude puhul rõhuvahemikus 10^{-1} kuni 10^5 Pa ja, kui rakendatakse ettevaatusabinõusid, ka rõhuvahemikus 1–10 Pa.

▼ M1

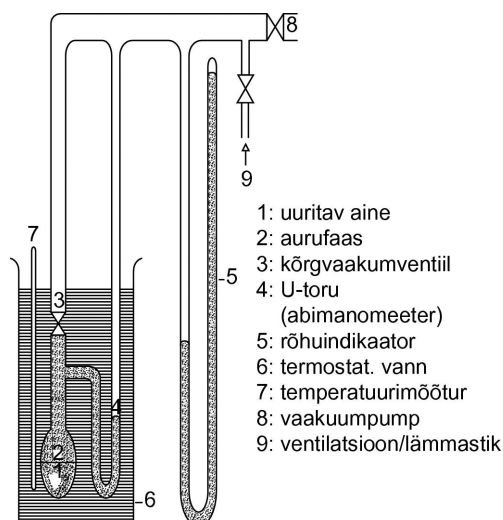
1.5.2.2. Mõõteseade

Mõõteseade koosneb termostateeritud vannist (täpsus $\pm 0,2$ K), vaakumsüsteemiga ühendatud proovinõust, manomeetrist ja rõhu reguleerimise süsteemist. Proovinõu (joonis 3a) ühendatakse kraani ja nullindikaatorina kasutatava diferentsiaalmanomeetri (sobiva manomeetriverdelikuga U-toru) kaudu vaakumsüsteemiga. Olenevalt rõhuvahemikust ja uuritava aine keemilistest omadustest võib diferentsiaalmanomeetris kasutada elavhõbedat, silikoonõlisid või ftalaate. Keskkonnakaitse kaalutlustel tuleks elavhõbeda kasutamist võimaluse korral hoiduda. Uuritav aine ei tohi U-torus olevas vedelikus märgatavalt lahustuda või sellega reageerida. U-toru asemel võib kasutada ka mõnda muud rõhumõõturit (joonis 3b). Normaalarõhust kuni rõhuni 10^2 Pa võib manomeetriverdelikuna kasutada elavhõbedat; kui rõhk on vahemikus $10-10^2$ Pa, võib kasutada silikoonõlisid ja ftalaate. Rõhul alla 10^2 Pa võib kasutada ka muid rõhumõõtureid; kuumutatava membraaniga mahtvusmanomeetrit võib kasutada isegi rõhul alla 10^{-1} Pa. Temperatuuri mõõdetakse kas proovinõu seina välisküljel või proovinõus.

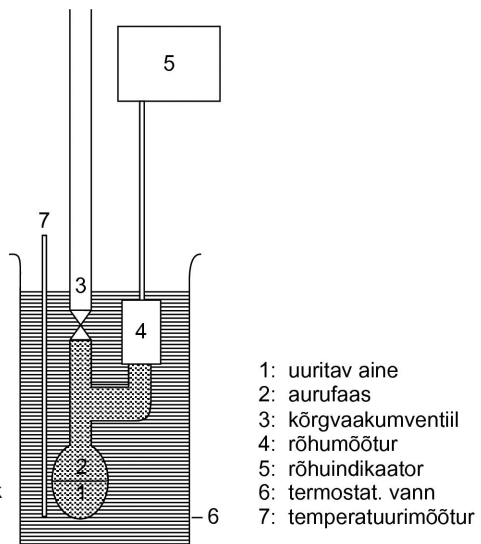
1.5.2.3. Mõõtmise käik

Kui kasutatakse joonisel 3a kujutatud mõõteseadet, täidetakse U-toru selleks valitud vedelikuga, mis tuleb enne näidu registreerimist gaasidest kõrgendatud temperatuuri abil vabastada. Uuritav aine viiakse mõõteseadmesse ja vabastatakse gaasidest madalal temperatuuril. Kui tegemist on mitmekomponendilise prooviga, peab temperatuur olema piisavalt madal, et seejuures ei muutuks materjali koostis. Tasakaalu kiiremaks saavutamiseks võib proovi segada. Proovi võib jahutada vedela lämmastiku või kuiva jääga, kuid seejuures tuleb jälgida, et õhk ja väljapumbatav gaas ei kondenseeruks. Proovinõu kohal oleva kraani avamisega ühendatakse nõu mõneks minutiks vaakumsüsteemiga, et eemaldada õhk. Vajaduse puhul korratakse gaaside eemaldamist mitu korda.

Joonis 3a



Joonis 3b



▼ **M1**

Kui proovi kuumutamise ajal on kraan suletud, siis aururõhk tõuseb. See muudab U-torus oleva vedeliku tasakaaluasendit. Selle kompenseerimiseks lastakse seadmesse lämmastikku või õhku, kuni diferentsiaalrõhu indikaator on uuesti nullasendis. Selleks vajalik rõhk loetakse manomeetrilt või suurema täpsusega mõõteriistalt. See rõhk vastab aine aururõhule mõõtmistemperatuuril. Kui kasutatakse joonisel 3b kujutatud mõõteseadet, võib aururõhu näidu lugeda otse seadmelt.

Aururõhk määratakse piisavalt väikeste temperatuurivahemike tagant kuni vajaliku kõrgeima temperatuurini (aururõhk mõõdetakse kokku umbes 5–10 tasakaalupunktis).

Kontrolliks korratakse näitude registreerimist madalal temperatuuril. Kui kordamisel saadud väärtused ei lange kokku temperatuuri tõstmisel saadud kõveraga, võib põhjuseks olla üks järgmistest asjaoludest:

- i) proov sisaldab ikka veel õhku (nt suure viskoossusega materjalide puhul) või kuumutamisel eraldunud madala keemistemperatuuriga aineid;
- ii) uuritavas temperatuurivahemikus toimub ainega keemiline reaktsioon (nt lagunemine või polümerisatsioon).

1.5.3. **Isoteniskoopiline meetod**

1.5.3.1. *Põhimõte*

Isoteniskoop (6) töötab staatilise meetodi põhimõttel. Proov viiakse termostateeritud kolbi, mis on ühendatud manomeetri ja vaakumpumbaga. Uuritavast ainest kergemini lenduvad lisandid eemaldatakse degaseerimisega alarõhul. Proovi aururõhk valitud temperatuuril tasakaalustatakse inertse gaasi rõhuga, mille väärtus on teada. Isoteniskoop töötati välja teatavate vedelate süsivesinike aururõhu määramiseks, kuid ta sobib ka tahkete ainete uurimiseks. Harilikult ei sobi kõnesolev meetod mitmekomponendiliste süsteemide puhul kasutamiseks. Mittelenduvaid lisandeid sisaldavate proovide korral on mõõtmistulemuste viga väike. Soovitav määramisvahemik on 10^2 – 10^5 Pa.

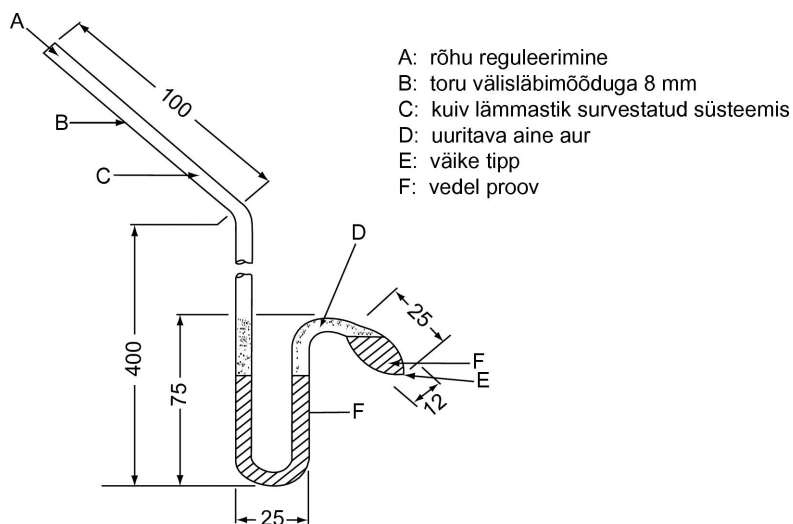
1.5.3.2. *Mõõtesead*

Mõõteseadme näidis on esitatud joonisel 4. Seadme täielik kirjeldus on standardis ASTM D 2879–86 (6).

▼ **M1**1.5.3.3. *Mõõtmise käik*

Vedelate ainete puhul on diferentsiaalmanomeetri vedelikuks uuritav aine ise. Isoteniskooopi viiakse vedelikukogus, mis on küllaldane reservuaari ja manomeetri lühikese haru täitmiseks. Isoteniskoop ühendatakse vaakumsüsteemiga, sellest eemaldatakse õhk ning see täidetakse seejärel lämmastikuga. Süsteemist gaasi väljapumpamist ja süsteemi täitmist lämmastikuga korratakse kaks korda, et eemaldada kogu hapnik. Täidetud isoteniskoop asetatakse horisontaalselt, nii et proov valgub õhukese kihina reservuaaris ja manomeetris laiali. Rõhk süsteemis langetatakse 133 paskalini ja proovi kuumutatakse ettevaatlikult, kuni see hakkab keema (seda tehakse lahustunud gaaside kõrvaldamiseks). Isoteniskoop asetatakse seejärel nii, et proov voolab tagasi reservuaari ja täidab manomeetri lühikese haru. Rõhku hoitakse 133 Pa juures. Proovireservuaari väljavenitatud tippu kuumutatakse väikesel leegil, kuni proovi aurud küllaldaselt paisuvad ning suruvad osa proovist reservuaari ülaosast ja manomeetri lühikesest harust manomeetri ülejäänud ossa, nii et tekib auruga täidetud lämmastikuvaba ruum. Isoteniskoop paigutatakse seejärel termostateeritud vanni ja lämmastiku rõhk võrdsustatakse proovipoolse ruumi rõhuga. Tasakaaluolekus on lämmastiku rõhk võrdne aine aururõhuga.

Joonis 4



(mõõtmised on millimeetrites)

Tahkete ainete puhul kasutatakse rõhust ja temperatuurivahemikust olenevalt selliseid manomeetriverdelikke, nagu silikoonõlid ja ftalaadid. Gaasidest vabastatud manomeetriverdelik viiakse isoteniskooopi pikal harul olevasse laiemasse ossa. Uuritav tahke aine pannakse proovikolbi ja vabastatakse gaasidest kõrgendatud temperatuuril. Seejärel kallutatakse isoteniskooopi nii, et manomeetriverdelik voolab U-torusse.

▼ **M1**1.5.4. **Efusioonmeetod: aururõhukaalud (7)**1.5.4.1. *Põhimõte*

Uuritava aine proovi kuumutatakse väikeses ahjus ja asetatakse vakumeeritud klaaskupli alla. Ahi on kaetud kaanega, milles on väikesed teadaoleva läbimõõduga avad. Ühest avast väljuv aine aur juhitakse sama vakumeeritud klaaskupli all asuva kõrgtundliku kaalu kausile. Mõne seadmetüübi puhul asub kaalukauss külmkambris, mis tagab soojuse hajumise väljapoole soojusjuhtivuse teel; kaalukauss jahtub soojuskiirguse arvel ja avast väljuv aur kondenseerub kaalukaussil. Aurujoo impuls toimib kaalukaussile mõjuva jõuna. Aururõhu võib arvutada kahel viisil: kas otse kaalukaussile mõjuva jõu põhjal või aurustumiskiiruse alusel, kasutades Hertz-Knudseni valemit (2):

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

kus:

G = aurustumiskiirus ($\text{kg s}^{-1} \text{m}^{-2}$),

M = molaarmass (g mol^{-1}),

T = temperatuur (K),

R = universaalne gaasikonstant ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$),

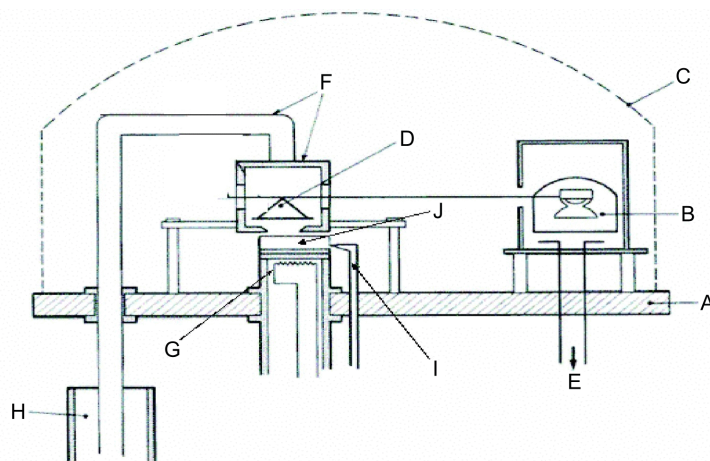
p = aururõhk (Pa).

Soovitav määramisvahemik on 10^{-3} kuni 1 Pa.

1.5.4.2. *Mõõteseade*

Seadme üldpõhimõte on esitatud joonisel 5.

Joonis 5



A:	alusplaat	F:	külmkamber ja jahutuslatt
B:	magnetelektriline seade	G:	aurustusahi
C:	klaaskuppel	H:	Dewari anum vedela lämmastikuga
D:	kaalud ja kaalukauss	I:	proovi temperatuuri mõõtur
E:	vaakumimõõtur	J:	uuritav proov

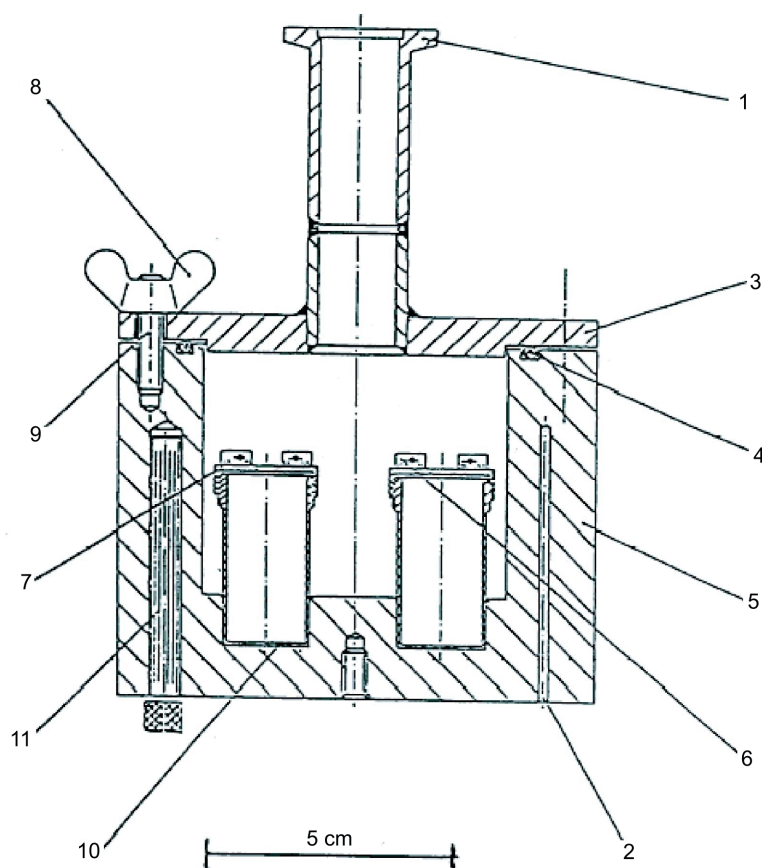
▼ **M1**1.5.5. **Efusioonmeetod: Knudseni rakk**1.5.5.1. *Põhimõte*

Meetodi aluseks on kõrgvaakumi tingimustes Knudseni raku (8) mikroavast ajaühikus auruna väljuva uuritava aine massi määramine. Väljavoolanud auru massi võib leida kas raku massi vähenemise määramise kaudu või auru madalal temperatuuril kondenseerimise ja lendunud ainekoguse kromatograafilise määramisega. Aururõhk arvutatakse Hertz-Knudseni võrrandi abil (vt punkt 1.5.4.1), kasutades seadme parameetritest sõltuvat parandustegurit (9). Soovitatav aururõhu vahemik on 10^{-10} kuni 1 Pa (10, 11, 12, 13, 14).

1.5.5.2. *Mõõteseade*

Seadme üldpõhimõte on esitatud joonisel 6.

Joonis 6



- | | |
|---|--|
| 1: ühendus vaakumsüsteemiga | 7: keermega kaas |
| 2: pesad plaatina-takistustermomeetri või temperatuuri mõõtmise ja reguleerimise seadme jaoks | 8: liblikmutrid |
| 3: vaakumhuti kaas | 9: poldid |
| 4: O-rõngas | 10: roostevabast terasest efusioonirakud |
| 5: alumiiniumist vaakumhuti | 11: padrunkuumuti |
| 6: efusioonirakkude paigaldamise ja eemaldamise seade | |

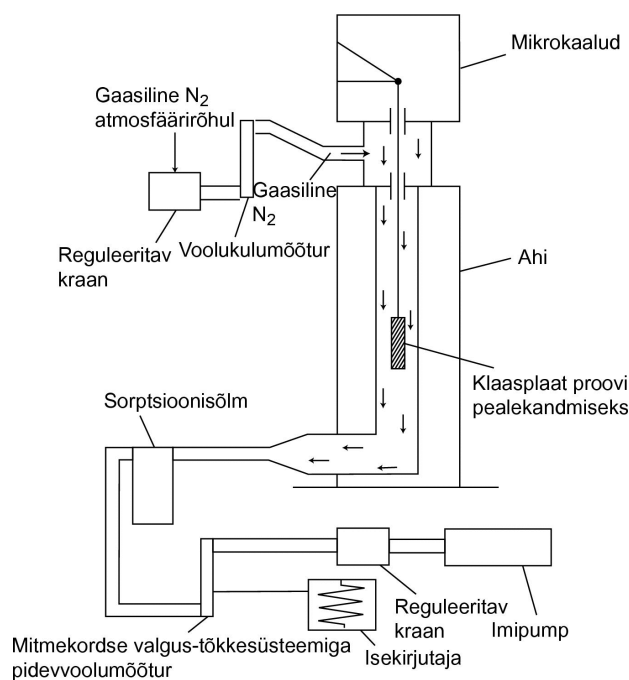
▼ **M1**1.5.6. **Efusioonmeetod: isothermiline termogravimeetria**1.5.6.1. *Põhimõte*

Meetod põhineb uuritava aine kiirenenud aurustumise määramisel kõrgendatud temperatuuril ja normaalrõhul termogravimeetria abil (10, 15, 16, 17, 18, 19, (20)). Aurustumiskiiruse v_T määramiseks hoitakse uuritavat ainet aeglaselt voolava inertgaasi atmosfääris kindlaksmääratud isothermilisel temperatuuril T (kelvinites) ja jälgitakse vajaliku ajavahemiku jooksul, kuidas väheneb ainekoguse mass. Aururõhud p_T arvutatakse v_T väärtuste põhjal, kasutades aururõhu logaritmi ja aurustumiskiiruse logaritmi lineaarset seost. Vajaduse korral võib tulemused ekstrapoleerida temperatuuridele 20 ja 25 °C, rakendades regressioonanalüüsi koordinaatides $\log p_T$ vs. $1/T$. See meetod sobib ainete puhul, mille aururõhk on 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar) ja puhtusaste on võimalikult lähedane 100 protsendile, et vältida mõõdetava massi vähenemise ekslikku tõlgendamist.

1.5.6.2. *Mõõteseade*

Mõõteseadme üldpõhimõte on esitatud joonisel 7.

Joonis 7



Proov kandeplaadil, mis ripub mikrokaalul reguleeritava temperatuuriga kambris, asub kuiva lämmastiku voolus, mis kannab uuritava aine aurustunud molekulid ära. Kambrist väljuv gaas puhastatakse sorptsiooniseadmes.

1.5.6.3. *Mõõtmise käik*

Uuritav aine kantakse ühtlase kihina karestatud klaasplaadi pinnale. Tahke aine puhul niisutatakse plaat ühtlaselt aine lahusega sobivas lahustis ja kuivatatakse inertgaasi atmosfääris. Ainekihiga klaasplaat riputatakse mõõtmiste tegemiseks termogravimeetrilisse analüsaatorisse ja mõõdetakse pidevalt klaasplaadi massi vähenemist ajas.

▼ **M1**

Aurustumiskiirus v_T kindlaksmääratud temperatuuril arvutatakse proovi massi vähenemise Δm alusel järgmise valemi abil:

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

kus F on klaasplaati katva aine pindala (tavaliselt võrdne klaasplaadi pindalaga) ja t on aeg, mille jooksul mass väheneb.

Aururõhk p_T arvutatakse aurustumiskiirust v_T väljendava funktsiooni alusel:

$$\log p_T = C + D \log v_T$$

kus C ja D on katseseadet iseloomustavad konstandid, mis olenevad mõõtekambri läbimõõdust ja gaasivoo kiirusest. Need konstandid määratakse üks kord, mõõtes teadaoleva aururõhuga ainete seeria aurustumiskiirused ja kasutades regressioonanalüüsi $\log p_T$ vs. $\log v_T$ (11, 21, 22).

Aururõhu p_T ja kelvinites väljendatud temperatuuri T vahelist seost kajastab võrrand

$$\log p_T = A + B 1/T$$

kus A ja B on regressioonseosest $\log p_T$ vs. $1/T$ saadud konstandid. Selle võrrandi alusel saab arvutada aururõhu mis tahes muu temperatuuri juures ekstrapoleerimise teel.

1.5.7. **Gaasiküllastusmeetod (23)**1.5.7.1. *Põhimõte*

Üle või läbi uuritava aine proovi voolutatakse toatemperatuuril inertgaasi teadaoleva piisavalt väikese kiirusega, mis tagab gaasi küllastumise. Gaasifaasi küllastamine on väga tähtis. Kaasa kandunud aine kogutakse, kasutades püüdurina enamasti sorbenti, ja määratakse selle kogus. Auru püüdmise ja edasise analüüsi alternatiivina võib kaasa kandunud materjali koguse määramiseks kasutada ka järjestikku ühendatud analüüsiseadet, näiteks gaasikromatograafi. Aururõhu arvutamisel eeldatakse, et süsteem järgib ideaalse gaasi olekuvõrrandit ja gaasisegu üldrõhk on võrdne komponentgaaside rõhkude summaga. Uuritava aine partsiaalrõhu ehk aururõhu arvutamisel lähtutakse teadaolevast gaasi ruumalast ja kaasa kantud materjali massist.

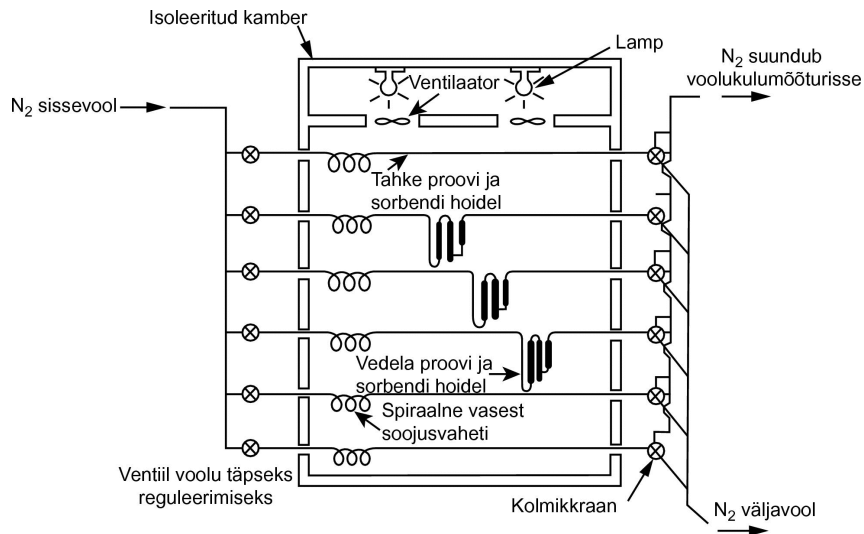
Gaasiküllastusmeetod on rakendatav nii tahkete kui ka vedelate ainete korral. Seda võib kasutada ka madalal rõhul kuni 10^{-10} Pa (10, 11, 12, 13, 14). Kõnesolev meetod on kõige usaldusväärsem aururõhul alla 10^3 Pa. Aururõhul üle 10^3 Pa saadakse tavaliselt õigetest suuremad väärtused, mis on tõenäoliselt tingitud aerosooli tekkimisest. Kuna aururõhu mõõtmised tehakse toatemperatuuril, ei ole vaja ekstrapoleerida kõrgetel temperatuuridel saadud andmeid; sellega välditakse sageli tõsiseid vigu põhjustavat ekstrapoleerimist kõrgetelt temperatuuridelt.

1.5.7.2. *Mõõteseade*

Mõõtmiseks on vaja konstantse temperatuuriga kambrit. Joonisel 8 oleval skeemil on kamber, milles on kolm hoidlit tahketele proovidele ja kolm hoidlit vedelatele proovidele; see võimaldab teha tahke või vedela prooviga kolm analüüsi. Temperatuuri reguleeritakse $\pm 0,5$ °C või suurema täpsusega.

▼ M1

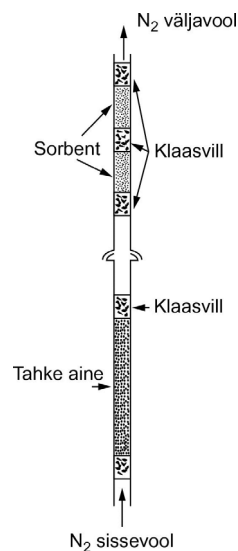
Joonis 8



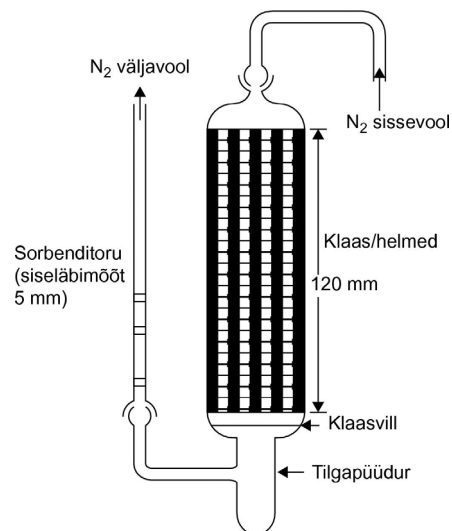
Üldiselt kasutatakse inertse kandegaasina lämmastikku, kuid mõnikord on vaja kasutada ka muid gaase (24). Kandegaas peab olema kuiv. Gaasivoog jaotatakse kuueks vooks, mida reguleeritakse nõelventiilide abil (ava läbimõõt ligikaudu 0,79 mm); need vood juhitakse 3,8 mm siseläbimõõduga vasktorude kaudu kambrisse. Pärast temperatuuri tasakaalustumist läbib gaas proovi ja sorbentpüünise ning väljub kambrist.

Tahke proov asetatakse 5-millimeetrise siseläbimõõduga klaastorusse klaasvillast korkide vahele (vt joonis 9). Joonisel 10 on näidatud vedela proovi hoidel ja sorptsioonisõlm. Vedeliku aururõhu mõõtmised on kõige paremini reprodutseeritavad, kui vedelik kantakse klaashelmestele või mõnele muule inertssele sorbendile, nagu räni-dioksiid, ning hoidel täidetakse selliselt kaetud helmestega. Alternatiivina võib kandegaasi voolutada läbi jämeda friti või barboteerida uuritava vedelikuga täidetud kolonni kandegaasiga.

Joonis 9



Joonis 10



▼ M1

Sorptsioonisõlmes on eel- ja järeladsorptsiooni sektsioon. Väga madala aururõhu puhul võib olla tõsiseks probleemiks adsorptsiooniproovi ning adsorbendi vahel oleval klaasvillal ja klaastorudel, kusjuures sorbendile jääb ainult väike kogus uuritavat ainet.

Tõhus viis aurustunud materjali kogumiseks on kasutada süsihappelumega jahutatavat püüdurit. Selline püüdur ei avalda vasturõhku küllastuskolonnile ja sellest on kerge püütud materjali kvantitatiivselt eemaldada.

1.5.7.3. *Mõõtmise käik*

Kandegaasi voolukiirust mõõdetakse toatemperatuuril. Voolukiirust kontrollitakse katse ajal sageli, et tagada kandegaasi üldmahu õige määramine. Parem on seda massivoolumõõtu abil pidevalt mõõta. Gaasifaasi küllastumiseks peab kokkupuuteaeg olema küllalt pikk ja gaasivoolu kiirus väike (25).

Katse lõpus analüüsitakse eel- ja järeladsorptsiooni sektsiooni eraldi. Kummastki sektsioonist desorbeeritakse uuritav aine lahusti abil. Saadud lahuseid analüüsitakse kvantitatiivselt kummastki sektsioonist desorbeeritud massi määramiseks. Analüüsimeetodi (ja ka sorbendi ja desorbeeriva lahusti) valik oleneb uuritavast ainest. Desorptsiooni täielikkuse määramiseks kantakse teadaolev kogus uuritavat proovi sorbendile, desorbeeritakse, ja määratakse aine saagis. Desorptsiooni tõhusust on vaja kontrollida samal või ligikaudu samal uuritava proovi kontsentratsioonil, mis esineb mõõtmise puhul.

Tagamaks, et kandegaas on uuritava ainega küllastunud, kasutatakse kolme erinevat gaasivoolu kiirust. Kui arvatud aururõhk ei olene voolukiirusest, peetakse kandegaasi küllastunuks.

Aururõhk arvutatakse järgmise valemi abil:

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

kus:

p = aururõhk (Pa),

W = aurustunud uuritava aine mass (g),

V = küllastunud kandegaasi maht (m³),

R = universaalne gaasikonstant, 8,314 (Jmol⁻¹K⁻¹),

T = temperatuur (K),

M = uuritava aine molaarmass (gmol⁻¹).

Mõõdetud mahu väärtusi on vaja parandada, et arvestada rõhu ja temperatuuri erinevusi voolumõõtu ja küllastuskolonniga.

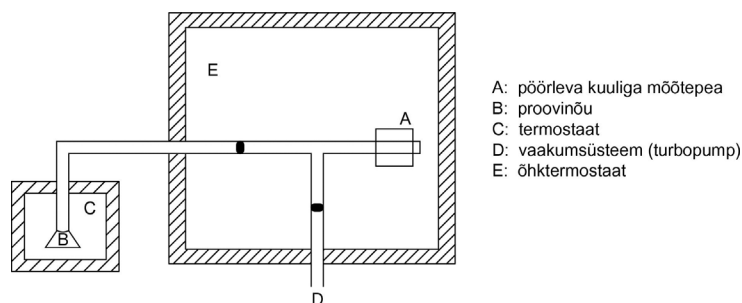
▼ **M1**1.5.8. **Pöörleva kuuli meetod**1.5.8.1. *Põhimõte*

Selle meetodi puhul kasutatakse pöörleva kuuli põhimõttel töötavat viskoossusmõõturit, mille mõõteelement on magnetväljas hõljuv väike teraskuul, mis pannakse pöörlevate magnetväljade abil pöörlema (26, 27, 28). Kuuli pöörlemiskiirust saab mõõta andurmähiste abil. Kui kuul on jõudnud ettenähtud pöörlemiskiiruseni (tavaliselt umbes 400 pööret sekundis), lõpetatakse edasine kiirendamine ja kuuli pöörlemine hakkab hõõrdumise tõttu gaasikeskkonnas aeglustuma. Mõõdetakse pöörlemiskiiruse vähenemise sõltuvust ajast. Aururõhk tuletatakse teraskuulikese pöörlemiskiiruse vähenemisest, mis on oleneb rõhust. Soovitatav määramisvahemik on 10^{-4} kuni 0,5 Pa.

1.5.8.2. *Mõõteseade*

Katseseadme skeem on esitatud joonisel 11. Mõõtepea asetatakse $0,1\text{ °C}$ täpsusega termostateeritavasse kambrisse. Proovinõu paigutatakse $0,1\text{ °C}$ täpsusega termostateeritud eraldi kambrisse ning seadme kõiki ülejäänud osi hoitakse kondensatsiooni vältimiseks kõrgemal temperatuuril. Kogu seade on ühendatud kõrgvaakumsüsteemiga.

Joonis 11

2. **MÕÕTMISANDMED JA MÕÕTMISPROTOKOLLI KOOSTAMINE**2.1. **MÕÕTMISANDMED**

Mis tahes eespool kirjeldatud meetodi kasutamise puhul määratakse aururõhk vähemalt kahel temperatuuril. Aururõhu sõltuvuse lineaarsuse kontrollimiseks tuleks eelistada aururõhu määramist kolmel või enamal temperatuuril vahemikus $0\text{--}50\text{ °C}$. Efusioonmeetodite (Knudseni rakk ja isotermiline termogravimeetria) ning gaasiküllastusmeetodi korral on temperatuurivahemiku $0\text{--}50\text{ °C}$ asemel soovitatav mõõta aururõhud vahemikus $120\text{--}150\text{ °C}$.

2.2. **MÕÕTMISPROTOKOLL**

Mõõtmisprotokollis esitatakse järgmine teave:

— kasutatud meetod;

▼ M1

- aine täpne iseloomustus (identifitseerimiseks vajalikud andmed, lisandid) ja eelneva puhastusetapi kirjeldus (kui ainet puhastati);
- vähemalt kaks, parem aga kolm või enam aururõhu ja temperatuuri väärtust vahemikus 0–50 °C (või 120–150 °C);
- kui see valitud meetodi puhul on tehniliselt võimalik, peaks vähemalt üks temperatuur olema 25 °C või madalam;
- kõik originaalandmed;
- kõver $\log p$ versus $1/T$;
- hinnanguline aururõhu väärtus 20 või 25 °C juures.

Kui esineb aine oleku muutusi (agregaatoleku muutumine, lagunemine), märgitakse järgmine teave:

- muutuse laad;
- atmosfäärirõhule vastav temperatuur, mille juures muutus toimub;
- aururõhk 10 ja 20 °C allpool olekumuutuse temperatuuri ning 10 ja 20 °C ülalpool seda temperatuuri (välja arvatud juhtum, kui agregaatolek muutub tahkest gaasiliseks).

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad andmed ja tähelepanekud, eriti sellised, mis käsitlevad lisandeid ja aine füüsilist olekut.

3. KIRJANDUS

- 1) Official Journal of the European Communities L 383 A, 26–47 (1992).
- 2) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol. II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, London.
- 3) Weissberger R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.
- 4) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.
- 5) NF T 20–048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10^{-1} to 10^5 Pa – Static method.
- 6) ASTM D 2879–86, Standard test method for vapour pressure – temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.
- 7) NF T 20–047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use – Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10^{-3} to 1 Pa – Vapour pressure balance method.

▼ M1

- 8) Knudsen, M. (1909). *Ann. Phys. Lpz.*, 29, 1979; (1911), 34, 593.
- 9) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). *J. Chem. Thermodynamics* 7, 1173.
- 10) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; *Pest Management Science* 56, 521–532.
- 11) Tomlin, C.D.S. (ed.), *The Pesticide Manual*, Twelfth Edition (2000).
- 12) Friedrich, K., Stambach, 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., Rittig, 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., Rittig, 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***Liide***Hindamismeetod****SISSEJUHATUS**

Hinnangulisi aururõhu väärtusi võib kasutada järgmistel juhtudel:

- sobiva katsemeetodi valimiseks;
- hinnangu või piirväärtuse andmiseks juhtudel, kui tehnilistel põhjustel ei saa mõõtmismeetodeid rakendada.

HINDAMISMEETOD

Vedelike ja tahkete ainete aururõhu hindamiseks võib kasutada teisendatud Watsoni korrelatsiooni (a). Ainus selleks vajalik eksperimentaalselt määratav väärtus on keemistemperatuur normaalrõhul. Meetod on rakendatav rõhuvahe-
mikus 10^5 kuni 10^{-5} Pa.

Meetodi üksikasjalik kirjeldus on esitatud väljaandes „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (b). Vt ka OECD Environmental Monograph No. 67 (c).

ARVUTUSKÄIK

Aururõhk arvutatakse järgmise valemi abil:

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

kus:

T = aururõhu hindamise temperatuur,

T_b = keemistemperatuur normaalrõhul,

P_{vp} = aururõhk temperatuuril T,

ΔH_{vb} = aurustumissoojus,

ΔZ_b = kokkusurutavustegur (hinnanguliselt 0,97),

m = empiiriline konstant, mis oleneb aine füüsikalise olekust aururõhu hindamise temperatuuril.

Kasutatakse ka valemit

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

kus K_F on aine polaarsust arvestav empiiriline tegur. Rea ühendklasside K_F -tegurid on esitatud publikatsioonis (b).

▼ M1

Sageli on olemas andmed keemistemperatuuri kohta madalamal rõhul. Sellisel juhul arvutatakse aururõhk järgmiselt:

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

kus T_1 on keemistemperatuur madalamal rõhul P_1 .

PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Kui kasutatakse hindamismeetodit, tuleb protokollis esitada täielik arvutuskäik.

KIRJANDUS

- 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. PINDPINEVUS****1. MEETOD**

Kirjeldatud meetodid põhinevad OECD katsesuunis (1). Meetodite tööpõhimõtted on ära toodud viites 2.

1.1. SISSEJUHATUS

Kirjeldatud meetodid on ette nähtud vesilahuste pindpinevuse mõõtmiseks.

Katse tegemiseks on kasulik teada aine lahustuvust vees, selle struktuuri, hüdrolüüsuvust ja mitsellitekke lävikonsentratsiooni.

Järgmised meetodid sobivad kohaldamiseks enamikule keemilistele ainetele, olenemata nende puhtusastmest.

Pindpinevust saab mõõta rõnga lahtirebimise meetodi abil ainult vesilahuste puhul, mille dünaamiline viskoossus on alla ca. 200 mPa s.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Pindpinevusena käsitatakse pinna vabaentalpiat pinnaühiku kohta.

Pindpinevust väljendatakse järgmistes ühikutes:

N/m (SI ühik) või

mN/m (SI alamühik)

1N/m = 103 dyn/cm

1 mN/m = 1 dyn/cm (aegunud CGS-süsteemis)

1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

Viidetes 1 ja 3 on ära toodud laia pindpinevuste vahemikku hõlmavad võrdlusained.

1.4. KATSEMEETODITE PÕHIMÕTE

Meetodite kohaselt mõõdetakse maksimaalne jõud, mida on vaja püstsuunas rakendada mõõtenõus oleva uuritava vedeliku pinnaga kokkupuutes olevale loogale või rõngale selle lahtirebimiseks pinnalt või pinnaga kokkupuutes oleva plaadi servale tekkinud kile ülestõmbamiseks.

Aineid, mille lahustuvus vees on vähemalt 1 mg/l, analüüsitakse vesilahuses ainult ühel kontsentratsioonil.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Nende meetodite täpsus ületab tõenäolised vajadused keskkonnaohetlikkuse hindamisel.

▼B

1.6. MEETODITE KIRJELDUS

Valmistatakse aine lahus destilleeritud vees. Lahuse kontsentratsioon peaks olema 90 % aine küllastuskontsentratsioonist vees; kui kontsentratsioon ületab 1 g/l, kasutatakse katses kontsentratsiooni 1 g/l. Aineid, mille lahustuvus vees on alla 1 mg/l, pole vaja testida.

1.6.1. **Pladimeetod**

Vt ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.2. **Loogameetod**

Vt ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.3. **Rõngameetod**

Vt ISO 304 ja NF T 73-060 (Surface active agents – determination of surface tension by drawing up liquid films).

1.6.4. **OECD ühtlustatud rõngameetod**1.6.4.1. *Seade*

Mõõtmiseks sobivad müügil olevad tensiomeetrid. Need koosnevad järgmistest osadest:

— liikuvast proovialusest;

— dünamomeetrist;

— mõõtekehast (rõngast);

— mõõtmisnõust.

1.6.4.1.1. **Liikuv proovialus**

Liikuvale proovialusele asetatakse uuritavat vedelikku sisaldav termostateeritud mõõtmisnõu. Alus kinnitatakse koos dünamomeetriga statiivile.

1.6.4.1.2. **Dünamomeeter**

Dünamomeeter (vt joonist) paikneb proovialuse kohal. Viga jõu mõõtmisel ei tohi ületada $\pm 10^{-6}$ N, mis vastab veapiirile $\pm 0,1$ mg massi mõõtmisel. Enamikul juhtudel on müügil olevate tensiomeetrite mõõteskaala kalibreeritud mN/m skaalas, nii et pindpinevuse saab skaalalt lugeda otse millinjuutonites meetri kohta täpsusega 0,1 mN/m.

▼ **B**

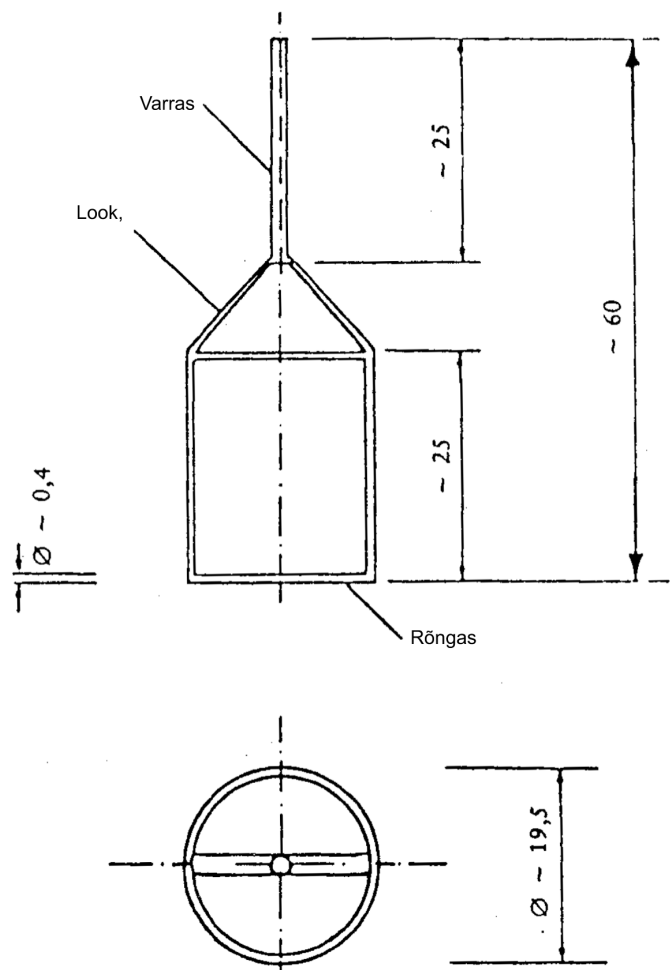
1.6.4.1.3. Mõõtekeha (rõngas)

Rõngas on tavaliselt valmistatud 0,4 mm jämedusest plaatina-iriidiumtraadist ja selle keskmine übermõõt on 60 mm. Rõngas ripub horisontaalselt metallvarda ja looga otsas, mille kaudu ta on ühendatud dünamomeetriga (vt joonist).

Joonis

Mõõtekeha

(Kõik mõõdud on millimeetrites)



1.6.4.1.4. Mõõtmisnõu

Katselahust sisaldava mõõtmisnõuna kasutatakse termostateeritud klaasnõud. Nõu ehitus peab olema selline, et katselahuse ja selle kohal oleva gaasifaasi temperatuurid jäävad katse kestel konstantseks ning proov ei aurustu. Mõõtmisnõuks sobivad silindrilised klaasnõud sisediameetriga vähemalt 45 mm.

▼B1.6.4.2. *Seadme ettevalmistamine*1.6.4.2.1. *Puhastamine*

Klaasnõud puhastatakse hoolikalt. Vajaduse korral pestakse neid kuuma kroomseguga ja seejärel kontsentreeritud fosforhappega (83–98 % H_3PO_4 (massi järgi)), loputatakse põhjalikult kraaniveega, pestakse lõpuks bidestilleeritud veega neutraalse reaktsiooni saavutamiseni ja seejärel kuivatatakse või loputatakse osaga mõõdetavast vedelikuproovist.

Rõngast loputatakse kõigepealt põhjalikult veega, et eemaldada vees lahustuvad ained, kastetakse seejärel lühikeseks ajaks kroomsegusse, pestakse siis bidestilleeritud veega neutraalse reaktsiooni saavutamiseni ja kuumutatakse lõpuks lühikest aega metanoolileegi kohal.

Märkus

Kroomsegus ja fosforhappes mittelahustuvad saasteained, nt siliioonid, eemaldatakse sobiva orgaanilise lahustiga.

1.6.4.2.2. *Seadme kaliibrimine*

Seadme kontrollimiseks kontrollitakse nullpunkti ja reguleeritakse seda nii, et seade võimaldab täpset mõõtmist mN/m skaalas.

Kinnitus

Seade looditakse tensiomeetri aluse reguleerimiskruvide abil (näiteks alusel oleva loodinäidiku järgi).

Nullpunkti reguleerimine

Pärast rõnga kinnitamist aparaadile ja enne selle vedelikku kastmist reguleeritakse tensiomeetri näit nulli ja kontrollitakse, kas rõngas on vedeliku pinnaga paralleelne. Selleks võib vedelikupinda kasutada peeglina.

Kaliibrimised

Seadme kaliibrimiseks võib kasutada üht kahest järgmisest meetodist.

- a) Raskuste abil: kasutatakse rõngale asetatavaid kindla massiga (0,1–1,0 g) raskusi. Kaliibrimistegur Φ_a , millega kõiki seadme näitusid tuleb korrutada, leitakse võrrandi 1 abil:

$$\Phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \quad (1)$$

kus:

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

m = raskuse mass (g)

g = raskuskiirendus (merepinnal 981 cm s⁻²)

b = rõnga keskmine übermõõt (cm)

σ_a = tensiomeetri näit pärast raskuse asetamist rõngale (mN/m).

▼B

- b) Vee abil: kasutatakse puhast vett, mille pindpinevus on näiteks 23 °C juures 72,3 mN/m.

Selle meetodi kohaselt toimub kaliibrimine kiiremini kui massi abil, kuid alati eksisteerib oht, et vee pindpinevust mõjutavad pindaktiivsed lisandid. Kaliibrimistegur Φ_b , millega kõiki seadme näitusid tuleb korrutada, leitakse võrrandi 2 abil:

$$\Phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g} \quad (2)$$

kus:

σ_o = vee pindpinevus (mN/m) kirjanduse andmetel

σ_g = mõõtmisel leitud vee pindpinevus (mN/m) mõlemal samal temperatuuril.

1.6.4.3. *Proovide ettevalmistamine*

Uuritavatest ainetest valmistatakse vajaliku kontsentratsiooniga vesilahused, kuhu ei tohi jääda lahustumatut jääki.

Lahust hoitakse püsival temperatuuril ($\pm 0,5$ °C). Kuna mõõtmisnõus oleva lahuse pindpinevus muutub aja jooksul, tehakse erinevatel aegadel mitu mõõtmist ja koostatakse kõver pindpinevuse muutumise kohta ajas. Kui pindpinevus enam ei muutu, on saavutatud tasakaal.

Mõõtmistulemusi mõjutavad tolm ja gaasilised lisandid. Seetõttu tuleb katsed teha suletud kambris.

1.6.5. **Katsetingimused**

Mõõtmised tehakse ligikaudu 20 °C juures ja temperatuuri reguleeritakse $\pm 0,5$ °C täpsusega.

1.6.6. **Katse tegemine**

Mõõdetavad lahused viiakse põhjalikult puhastatud mõõtmisnõusse, vältides hoolikalt vahutamist, ja mõõtmisnõu paigutatakse katseseadmesse proovialusele. Proovialust mõõtmisnõuga tõstetakse, kuni rõngas on allpool mõõdetava lahuse pinda. Seejärel lastakse proovialust järk-järgult ühtlaselt allapoole (kiirusega ligikaudu 0,5 cm/min), eemaldades rõngast pinnast kuni maksimaalse tõmbejõu saavutamiseni. Rõnga külge kinnitunud vedelikukiht ei tohi sellest eralduda. Pärast mõõtmiste lõppu viiakse rõngas jälle allapoole vedeliku pinda ja korratakse mõõtmisi, kuni jõutakse konstantsete pindpinevuse väärtusteni. Iga mõõtmise juures registreeritakse lahuse mõõtmisnõusse viimise möödunud aeg. Näidud võetakse rõnga vedelikupinnast lahtirebimiseks vajaliku maksimaalse jõu juures.

▼ B2. **ANDMED**

Pindpinevuse arvutamiseks tuleb seadme näit (mN/m) korrutada kaliibrimisteguriga Φ_a või Φ_b (sõltuvalt kasutatud kaliibrimismeetodist). Nii saadakse väärtus, mis on ainult ligikaudne ja vajab seega korrigeerimist.

Harkins ja Jordan (4) on empiirilisel kindlaks määranud rõngameetodi abil määratud pindpinevuse väärtuste parandustegurid, mis sõltuvad rõnga mõõtmest, vedeliku tihedusest ja pindpinevusest.

Kuna Harkinsi ja Jordani tabelitest iga mõõtmise jaoks eraldi parandustegurite leidmine vesilahuste pindpinevuse arvutamiseks on väga töömahukas, võib kasutada lihtsustatud meetodit, kus parandatud pindpinevuse väärtused loetakse otse tabelist. (Tabeliväärtuste vahele jäävate näitude puhul kasutatakse interpolatsiooni).

Tabel:

mõõdetud pindpinevuste parandused

Ainult vesilahuste jaoks, $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$

R	= 9,55 mm (rõnga keskmine raadius)
r	= 0,185 mm (rõngatraadi raadius)

Katseliselt mõõdetud väärtus (mN/m)	Parandatud väärtus (mN/m)	
	Kaliibrimine raskustega (vt 1.6.4.2.2a)	Kaliibrimine veega (vt 1.6.4.2.2b)
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

Katseliselt mõõdetud väärtus (mN/m)	Parandatud väärtus (mN/m)	
	Kaliibrimine raskustega (vt 1.6.4.2.2a)	Kaliibrimine veega (vt 1.6.4.2.2b)
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	—

Tabel on koostatud Harkinsi-Jordani paranduste põhjal. Tabel on sarnane DIN standardi (DIN 53914) tabeliga vee ja vesilahuste jaoks (tihedus $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$ ja kehtib müügil olevate rõngaste kohta mõõtmetega $R = 9,55 \text{ mm}$ (rõnga keskmine raadius) ja $r = 0,185 \text{ mm}$ (rõngatraadi raadius). Tabelis on esitatud pärast raskuste või veega kaliibrimist mõõdetud pindpinevuse väärtuste ka parandatud väärtused.

Pindpinevuse võib arvutada ka ilma eelneva kaliibrimiseta, kasutades järgmist valemit:

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

kus:

F = dünamomeetriga kile katkemisel mõõdetud jõud

R = rõnga raadius

f = parandustegur (1)

3. ARUANDLUS

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— kasutatud meetodit;

— kasutatud vee või lahuse iseloomu;

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);

— mõõtmistulemusi: pindpinevuse väärtused, sh kõik üksiktulemused ja nende aritmeetiline keskmine ning parandatud keskmine (mis arvestab nii seadmetest tulenevat parandustegurit kui ka parandustabelit);

▼B

- lahuse kontsentratsiooni;
- katsetemperatuuri;
- lahuse vanust, st aega lahuse valmistamise ja mõõtmise vahel;
- pindpinevuse sõltuvust lahuse mõõtmisnõusse viimisest möödunud ajast;
- registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmed ja märkused.

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Arvestades, et destilleeritud vee pindpinevus on 20 °C juures 72,75 mN/m, tuleks ained, mille pindpinevus käesoleva meetodi abil mõõtes on alla 60 mN/m, lugeda pindaktiivseteks aineteks.

4. VIITED

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. LAHUSTUVUS VEES****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 105 (1995). Käesolev katsemeetod on 1981. aastal vastu võetud esialgse meetodi TG 105 läbivaadatud versioon. Käesoleva versiooni ja 1981. aasta versiooni vahel ei ole sisulist erinevust, muudetud on peamiselt vormi. Läbivaadatud versioon põhineb ELi katsemeetodil „Lahustuvus vees” (1).

LÄHTEKAALUTLUSED

2. Uuritava aine lahustuvus vees võib lisandite mõjul oluliselt muutuda. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatakse, kuidas määrata sellise aine lahustuvust vees, mis on praktiliselt puhas, vees püsiv ja ei lendu. Enne vees lahustuvuse määramist on kasulik omada uuritava aine kohta mõningast eelteavet, nagu struktuurvalem, aururõhk, dissotsiatsioonikonstant ja hüdroolüüs sõltuvalt pH väärtusest.
3. Käesolevas katsemeetodis on kirjeldatud kahte meetodit: kolonn-elueerimismeetod ja kolvimeetod, millega on kaetud lahustuvuse vahemikud vastavalt kuni 10^{-2} g/l ja alates kontsentratsioonist 10^{-2} g/l. Kirjeldatud on ka lihtsat eeluurimist. Eeluurimistega saab määrata uuritava proovi ligikaudse sobiva koguse, mida tuleb kasutada lõpliku katse, samuti küllastumise saavutamiseks vajaliku aja.

MÕISTED JA ÜHIKUD

4. Aine lahustuvus vees on selle küllastav massikontsentratsioon vees antud temperatuuril.
5. Lahustuvust vees väljendatakse lahustunud aine massina lahuse ruumala kohta. Lahustuvuse SI-ühik on kg/m^3 ; võib kasutada ka ühikut g/l.

VÕRDLUSKEMIKAALID

6. Uuritava aine lahustuvuse määramisel ei ole vaja kasutada võrdluskemikaale.

MEETODITE KIRJELDUS**Katsetingimused**

7. Eelistatav katsetemperatuur on $20 \pm 0,5$ °C. Valitud temperatuur tuleks seadme kõigis olulistest osades hoida konstantsena.

Eeluurimist

8. Astmelise meetodi kasutamisel lisatakse toatemperatuuril 10-milliliitrises klaaskorgiga mõõtesilindris üha suuremaid veekoguseid umbes 0,1 grammile uuritavale ainele (tahke uuritav aine peab olema peenestatud). Pärast iga veekoguse lisamist loksutatakse segu kümme minutit ja kontrollitakse visuaalselt lahustumata proovijääkide olemasolu. Kui proov või osa sellest jääb pärast 10 ml vee lisamist lahustumata, jätkatakse katset 100 ml mõõtesilindris. Ligikaudne lahustuvus on esitatud tabelis 1 lisatud vee mahulise

▼ **M4**

koguse all, mille juures proov täielikult lahustub. Kui lahustuvus on väike, võib uuritava aine lahustamiseks kuluda palju aega ja katseks tuleb ette näha vähemalt 24 tundi. Kui 24 tunni möödumisel on osa uuritavast ainest ikka veel lahustumata, tuleb lahustamiseks näha ette rohkem aega (kuni 96 tundi) või kasutada suuremat lahjendust, et teha kindlaks, kas tuleb kasutada kolonn-elueerimis- või kolvimeetodit.

Tabel 1

Vee milliliitraid 0,1 g soluudi kohta	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Ligikaudne lahustuvus (g/l)	> 1 000	1 000 – 200	200–100	100–50	50–10	10–1	< 1

Kolonn-elueerimismeetod*Põhimõte*

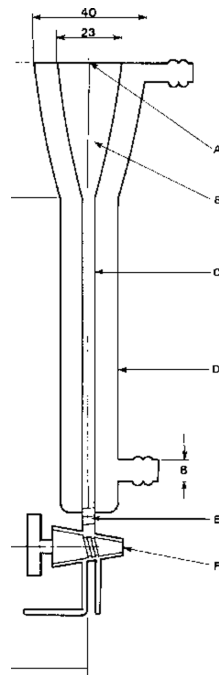
9. Meetodi aluseks on uuritava aine veega elueerimine mikrokolonnist, mis on täidetud inertse tugimaterjaliga, mis on eelnevalt kaetud uuritava aine liiaga ⁽²⁾. Lahustuvus vees leitakse eluaadi massikontsentratsioonist, kui eluaadi kontsentratsioon jõuab teatava aja järel platoole.

Seadmed

10. Seadmestik koosneb mikrokolonnist (joonis 1), mida hoitakse konstantse temperatuuri juures. Mikrokolonn on ühendatud kas tsirkulatsioonpumbaga (joonis 2) või ühtlustava anumaga (joonis 3). Mikrokolonn sisaldab inertset kandjat, mida hoiab paigal väike klaasvatikork, mis toimib ühtlasi ka osakeste filtrina. Võimalikud inertse kandjana kasutatavad materjalid on klaashelmed, diatomiit või muud inertsed materjalid.
11. Joonisel 1 kujutatud mikrokolonn sobib töötamiseks koos tsirkulatsioonpumbaga. Kolonnil on tühi ülaosa, mille maht on viis statsionaarse faasi mahtu (mis visatakse ära eksperimendi alguses) ja viis proovi ruumala (mis võetakse analüüsimiseks katse käigus). Seda vaba ruumi võib ka vähendada, kui lisandite kõrvaldamiseks kasutatava viie statsionaarse faasi mahu eluaadi asemele saab katse ajal lisada süsteemi vett. Kolonn on inertsest materjalist toru abil ühendatud tsirkulatsioonpumbaga, mille pumpamiskiirus on ligikaudu 25 ml/h. Tsirkulatsioonpump võib olla näiteks peristaltiline või membraanpump. Tuleb jälgida, et toru materjal ei põhjustaks saastumist ega adsorptsiooni.
12. Joonisel 3 on skemaatiliselt kujutatud tüüpiline ühtlustava anumaga süsteem. Selles süsteemis on mikrokolonn varustatud ühekäigukraaniga. Ühendamiseks ühtlustava anumaga on kasutatud klaaslihvühendust ja inertsest materjalist valmistatud voolikut. Lahuse ühtlustavast anumast välja voolamise kiirus peaks olema ligikaudu 25 ml/h.

▼ M4

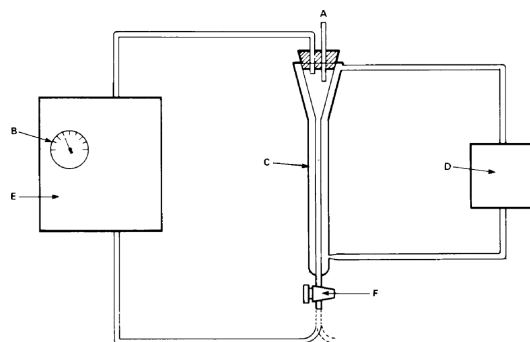
Joonis 1



Mõõtmed millimeetrites

- A. Lihvmuhv lihühenduse jaoks
- B. Vaba ruum kolonni peas
- C. Sisediaameeter 5 mm
- D. Välisdiameeter 19 mm
- E. Klaasvatist kork
- F. Kraan

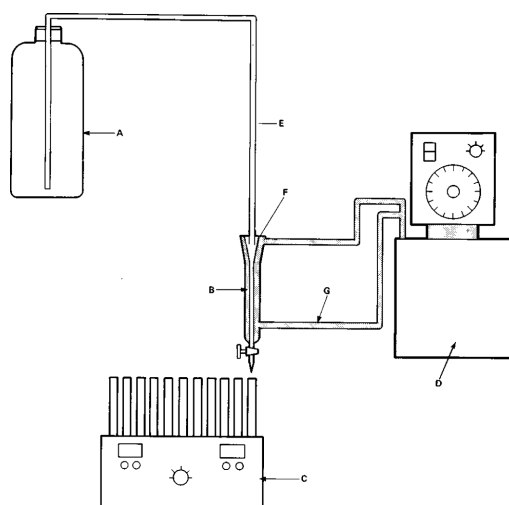
Joonis 2



- A. Tasakaalustamine atmosfäärirõhuga
- B. Voolumõõtur
- C. Mikrokolonn
- D. Termostateeritud tsirkulatsioonpump
- E. Tsirkulatsioonpump
- F. Kahekäigukraan proovide võtmiseks

▼ **M4**

Joonis 3



- A. Ühtlustav anum (nt 2,5 l kolb)
- B. Kolonn
- C. Fraktsioonikoguja
- D. Termostaat
- E. Teflonvoolik
- F. Klaaslihvühendus
- G. Veevoolik termostaadi ja kolonni vahel (sisediameeter ligikaudu 8 mm)
13. Ligikaudu 600 mg tugimaterjali kantakse 50 ml ümarkolbi. Sobiv kogus uuritavat ainet lahustatakse kergesti lenduvas analüüsireaktiivi puhtusklassiga lahustis ja sobiv kogus seda lahust lisatakse tugimaterjalile. Selleks et vältida jaotumist tugiaine pinnal ja saavutada elueerimisetapil tugiaine küllastumine veega, eemaldatakse lahusti täielikult, näiteks pöördaurusti kasutamisega. Kaetud tugimaterjali lastakse kaks tundi seista ligikaudu 5 ml vees ja seejärel viiakse suspensioon mikrokolonni. Teise võimalusena võib kuiva kaetud tugimaterjali kallata veega täidetud mikrokolonni ja lasta sel kaks tundi tasakaalustuda.
14. Tugimaterjali katmine uuritava ainega võib tekitada probleeme, mille tõttu saadakse valed tulemused, näiteks kui uuritav aine sadestub tugiainele õlina. Selliseid probleeme tuleks uurida ja katseprotokollis tuleks esitada üksikasjad.

Mõõtmine tsirkulatsioonpumba kasutamisega

15. Kolonni hakatakse voolutama. Soovitav on kasutada ligikaudset voolukiirust 25 ml/h, mis kirjeldatud kolonni puhul tähendab kümnet kolonni stationaarse faasi mahtu tunnis. Vähemalt esimesed viis stationaarse faasi mahtu visatakse ära, et eemaldada voolutamise vees lahustuvad lisandid. Seejärel lastakse tsirkulatsioonpumbal töötada tasakaalu saabumiseni, st senikaua, kuni viie järjestikuse proovi kontsentratsioonide erinevused on juhuslikud ega ületa $\pm 30\%$. Nende proovide vahelised ajavahemikud peaksid vastama ajale, mis kulub vähemalt kümne stationaarse faasi mahu eluendi voolamiseks läbi kolonni. Analüüsimeetodist olenevalt võib olla parem koostada graafik kontsentratsiooni sõltuvuse kohta ajast, millelt on näha tasakaalu saabumist.

▼M4*Määramine ühtlustava anuma kasutamise*

16. Tuleks koguda järjestikuseid eluaadifraktsioone ja analüüsida neid valitud meetodi abil. Aine lahustuvus vees määratakse eluaadi keskjooksust nende fraktsioonide põhjal, mille kontsentratsioonid jäävad vähemalt viie järjestikuse proovi kestel konstantseks ($\pm 30\%$).
17. Eelistatud voolutuskeskkond on bidestillleeritud vesi. Kasutada võib ka deioniseeritud vett, mille takistus on üle 10 megaoomi/cm ja orgaanilise süsiniku sisaldus alla 0,01 %.
18. Kummagi meetodi puhul tehakse teine voolutamine poole väiksema voolukiirusega kui esimene. Kui kahe voolutamise tulemused on kooskõlas, on katse tehtud rahuldavalt. Kui väiksema voolukiiruse juures on mõõdetud lahustuvus suurem, tuleb voolukiiruse poole võrra vähendamist jätkata seni, kui kahe järjestikuse voolutamise saadakse ühesugune lahustuvus.
19. Mõlema meetodi puhul tuleb Tyndalli efekti kasutamisega kontrollida, et fraktsioonid ei sisaldaks kolloidset ainet. Kolloidosakeste olemasolu korral katse tulemusi ei arvestata ja katset korratakse kolonniga, mille filtrivad omadused on paremad.
20. Tuleb mõõta iga proovi pH, eelistatult spetsiaalse indikaatorpabeririba abil.

Kolvimeetod*Põhimõte*

21. Aine (tahke aine peab olema peenestatud) lahustatakse vees katsetemperatuuril mõnevõrra kõrgemal temperatuuril. Küllastumise saavutamisel segu jahutatakse ja hoitakse katsetemperatuuril. Mõõtmist võib alustada ka kohe katsetemperatuuril, kui sobivate proovide võtmisega on näidatud, et küllastusakaal on saavutatud. Seejärel määratakse sobiva analüüsimeetodi (3) abil aine massikontsentratsioon vesilahuses, mis ei tohi sisaldada lahustumata osakesi.

Seadmed

22. Vaja on järgmisi materjale:

— tavalised labori klaasnõud ja seadmed;

— seade lahuse segamiseks konstantsel termostaaditemperatuuril;

— emulsiooni korral võib vaja minna tsentrifuugi (eelistatult termostateeritud), ning

— analüüsiseadmed.

Katse läbiviimise kord

23. Soovitud ruumala vee küllastamiseks vajalik uuritava aine kogus hinnatakse eeluuringu abil. Võetakse kolm klaaskorgiga klaasnõu (nt tsentrifuugiklaasid või kolvid) ja kaalutakse igähte umbes viiekordne eespool osutatud ainekogus. Igasse nõusse lisatakse teatav kogus vett; veekogus valitakse vastavalt analüüsimeetodile ja lahustuvuse vahemikule. Nõud suletakse tihedalt korgiga ja seejärel segatakse temperatuuril 30 °C. Kasutada tuleks konstantsel temperatuuril töötavat loksutit või segajat, nt magnetsegajat termostateeritud veevanniga. Ühe päeva pärast võetakse üks nõu ja tasakaalustatakse seda 24 h katsetemperatuuril aeg-ajalt loksutades. Nõu sisu tsentrifugeeritakse seejärel katsetemperatuuril ja määratakse siis sobiva analüüsimeetodi

▼M4

abil uuritava aine kontsentratsioon selges veefaasis. Sama korratakse ülejäänud kahe nõuga vastavalt kahe- ja kolmepäevase 30 °C juures eelneva tasakaalustamise järel. Kui vähemalt kahes viimases nõus määratud kontsentratsioonid ei erine rohkem kui 15 %, on katse tehtud rahuldavalt. Kui esimese, teise ja kolmanda nõu mõõtmisel saadud tulemustes ilmneb kasvutendents, tuleb katset korrata pikemate tasakaalustamisaegadega.

24. Katse võib teha ka ilma eelneva inkubeerimiseta 30 °C juures. Küllastumistasakaalu saavutamise kiiruse hindamiseks võetakse proove senikaua, kuni mõõdetav kontsentratsioon enam ei sõltu segamise ajast.
25. Tuleb mõõta iga proovi pH, eelistatult spetsiaalse indikaatorpabeririba abil.

Analüütilised määramised

26. Määramisel eelistatakse spetsiifilisi uuritava aine määramise meetodeid, kuna juba väike lisandikogus võib mõõdetud lahustuvuse väärtuses põhjustada suure vea. Sellised meetodid on näiteks gaas- või vedelikkromatograafia, tiitrimine, fotomeetria, voltameetria.

ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmed***Kolonn-elueerimismeetod*

27. Iga katse puhul tuleks välja arvutada vähemalt viie järjestikuse küllastusplaatool võetud proovi keskmine väärtus ja standardhälve. Eri voolukiiruste juures tehtud kahe katse keskmised väärtused ei tohiks erineda rohkem kui 30 %.

Kolvimeetod

28. Kolme kolvi määramisel saadud üksiktulemused, mis ei tohiks erineda üle 15 %, keskmistatakse.

Katseprotokoll*Kolonn-elueerimismeetod*

29. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave:

- eeluuringu tulemused;
- aine keemiline määratlus ja lisandid (eelnevad puhastamiseta, kui ainet puhastati);
- iga proovi kontsentratsioon, voolukiirus ja pH;
- iga katse kohta vähemalt viie küllastusplaatool võetud proovi keskmine väärtus ja standardhälve;
- vähemalt kahe järjestikuse katse keskmine väärtus;
- vee temperatuur küllastamise ajal;
- analüüsimeetod;
- kasutatud tugimaterjal;
- tugimaterjali katmisega seotud andmed;
- kasutatud lahusti;
- andmed aine mis tahes keemilise ebastabiilsuse kohta katse tingimustes;
- kogu muu asjakohane teave, eriti lisandite ja aine füüsikalise oleku kohta, mis võib mõjutada tulemuste tõlgendamist.

▼M4*Kolvimeetod*

30. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave:
- eeluuringu tulemused;
 - aine keemiline määratlus ja lisandid (eelnevad puhastamisetapid, kui ainet puhastati);
 - iga üksiku analüüsi tulemus ja tulemuste keskmine, kui ühe kolvi kohta tehti mitu mõõtmist;
 - iga proovi pH väärtus;
 - eri kolbidega saadud kooskõlaliste tulemuste keskvaärtused;
 - katsetemperatuur;
 - analüüsimeetod;
 - andmed aine mis tahes keemilise ebastabiilsuse kohta katse tingimustes;
 - kogu muu asjakohane teave, eriti lisandite ja aine füüsikalise oleku kohta, mis võib mõjutada tulemuste tõlgendamist.

KIRJANDUS

- 1) Komisjoni direktiiv 92/69/EMÜ, 31. juuli 1992, millega seitsmeteistkümnendat korda kohandatakse tehnika arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta (EÜT L 383, 29.12.1992, lk 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. JAOTUSTEGUR****1. MEETOD**

Kirjelatud „loksutamismeetod” põhineb OECD katsesuunisil (1).

1.1. SISSEJUHATUS

Katse tegemiseks on kasulik teada aine struktuuri ja dissotsiatsioonikonstanti, lahustuvust vees, hüdrolüüsuvust, lahustuvust oktaanoolis ja pindpinevust.

Sooli moodustavate ainete puhul tuleks mõõtmisi teha ainult vabas olekus ainega (vabal happel või vabal alusel), mis saadakse sobiva puhverlahuse kasutamisel pH-ga vähemalt ühe ühiku võrra alla (vaba happe saamiseks) või üle (vaba aluse saamiseks) vastava pK.

Katsemeetod sisaldab kaht eraldi protseduuri: loksutamismeetodit ja kõrge eraldusvõimega vedelikkromatograafiat (HPLC). Esimest meetodit kasutatakse ainetel $\log P_{ow}$ (mõisteid vt allpool) väärtusega vahemikus -2 kuni 4 , viimast ainetel $\log P_{ow}$ väärtusega vahemikus 0 kuni 6 . Enne kummagi katseprotseduuri rakendamist tuleks varem kindlaks teha jaotusteguri hinnanguline väärtus.

Loksutamismeetodit saab kasutada ainult puhaste, vees ja oktaanoolis lahustuvate ainete puhul. Seda ei saa kasutada pindaktiivsete ainete korral (viimaste puhul tuleks esitada arvutuslikult leitud väärtus või hinnanguline väärtus, mis on leitud üksikute lahustuvuste põhjal oktaanoolis ja vees).

HPLC meetodit ei saa kasutada tugevate hapete ega aluste, metalli-komplekside, pindaktiivsete ainete ega eluendiga reageerivate ainete puhul. Nende ainete korral tuleks esitada arvutuslikult leitud väärtus või hinnanguline väärtus, mis on leitud üksikute lahustuvuste põhjal oktaanoolis ja vees).

HPLC meetod on katseühendis olevate lisandite suhtes vähem tundlik kui loksutamismeetod. Sellele vaatamata võivad lisandid tulemuste tõlgendamise keeruliseks muuta, kuna piike ei saa enam kindlalt identifitseerida. Eristamatute piikidega segude puhul tuleks esitada $\log P$ ülemine ja alumine piir.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Jaotustegur (P) on määratletud lahustunud aine tasakaalukontsentratsioonide (c_n) suhtena kahest praktiliselt segunematust lahustist koosnevas kahefaasilises süsteemis. Oktaanooli ja vee puhul:

$$P_{ow} = \frac{c_n - \text{oktaanool}}{c_{\text{veesi}}}$$

Jaotustegur (P) on seega kahe kontsentratsiooni suhe ja seda väljendatakse harilikult kümnendlogaritmina ($\log P$).

▼B

1.3. VÕRDLUSAINED

Loksutamismeetod

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

HPLC meetod

Ühendi HPLC mõõtmistulemuste ja tema P väärtuse vastavuse leidmiseks tuleb koostada vähemalt kuue punktiga kalibreerimiskõver telgedes log P vs. HPLC mõõtmistulemused. Sobivad võrdlusained peab valima analüüsi sooritaja. Võimaluse korral peaks üks võrdlusühend olema testainest kõrgema ja üks madalama P_{OW} väärtusega. Log P väärtustel alla 4 piisab kalibreerimiseks loksutamismeetodil saadud andmetest. Log P väärtustel üle 4 võib kalibreerimiseks kasutada kirjanduses esitatud andmeid, kui need on kooskõlas arvutuslikult leitud väärtustega. Suurema täpsuse huvides on eelistatav kasutada testainele struktuuriliselt lähedasi võrdlusühendeid.

Kirjandusest on paljude ainerühmade kohta võimalik leida ulatuslikke andmekogumeid log P_{OW} väärtustega (2, 3). Kui samalaadse struktuuriga ühendite jaotustegurite kohta andmed puuduvad, võib kasutada vähem spetsiifilist kalibreerimist muude võrdlusühenditega.

Liites 2 esitatakse soovitatavate võrdlusainete ja nende P_{OW} väärtuste nimekiri.

1.4. KATSEMEETODITE PÕHIMÕTE

1.4.1. **Loksutamismeetod**

Jaotusteguri määramiseks tuleb saavutada kõigi süsteemi vastastiktoimes olevate komponentide tasakaal ja määrata siis kummaski faasis lahustunud ainete kontsentratsioonid. Selleteemalise kirjanduse põhjal on selleks võimalik kasutada mitmeid erinevaid meetodeid; nt kaks faasi segatakse põhjalikult ja eraldatakse seejärel uuritava aine tasakaalukontsentratsiooni määramiseks.

1.4.2. **HPLC meetod**

HPLC jaoks kasutatakse müügil olevaid analüütilisi kolonne, mille täidiseks on pikkade (nt C_8 , C_{18}) silikageeliga seotud süsivesinikahelatega tahke faas. Seesugusesse kolonni süstitud kemikaalid liiguvad selles erinevate kiirustega, kuna jaotuvad liikuva faasi ja statsionaarse süsivesinikfaasi vahel erinevalt. Kemikaalide segud elueeruvad oma hüdfoobsuse järjekorras – vees lahustuvad kemikaalid elueeruvad esimesena ja rasvlahustuvad viimasena, olenevalt oma süsivesiniku-vee jaotustegurist. Nii on retentsiooniaega sellises (pöördfaasilises) kolonnis võimalik seostada oktanooli/vee jaotusteguriga. Jaotustegur leitakse mahtuvustegurist k, mille valem on järgmine:

▼B

$$k = \frac{t_r - t_0}{t_0}$$

kus t_r = testaine retentsiooniaeg ja t_0 = keskmine aeg, mille jooksul lahustimolekul läbib kolonni (surnud aeg).

Kvantitatiivne analüüs pole vajalik, määrata tuleb ainult retentsiooniajad.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

1.5.1. **Korratavus***Loksutamismeetod*

Leitava jaotusteguri täpsuse tagamiseks tehakse kordusmõõtmised kolmedel erinevatel katsetingimustel, erineva ainekoguse ja erineva lahustite mahu suhtega. Korduskatsetel määratud jaotusteguri väärtused peaksid logaritmina väljendatuna $\pm 0,3$ ühiku täpsusega kokku langema.

HPLC meetod

Mõõtmistulemuste usaldusväärsuse parandamiseks tuleks teha kordusmõõtmised. Üksikutel mõõtmistel määratud log P väärtused peaksid $\pm 0,1$ ühiku täpsusega kokku langema.

1.5.2. **Tundlikkus***Loksutamismeetod*

Meetodi mõõtepiirkonna määrab kasutatava analüüsimeetodi avastamispiir. See peaks võimaldama määrata log P_{OW} väärtused vahemikus -2 kuni 4 (mõningatel tingimustel võib ülemist piiri nihutada kuni log P_{OW} väärtuseni 5) eeldusel, et lahustunud aine kontsentratsioon kummaski faasis ei ületa $0,01$ mooli liitris.

HPLC meetod

HPLC meetod võimaldab määrata jaotusteguri log P_{OW} vahemikus $0-6$.

Üldjuhul langeb selle meetodi abil määratud jaotusteguri logaritmiline väärtus ± 1 ühiku täpsusega kokku loksutamismeetodi abil leitud väärtusega. Tüüpilisi vastavusi võib leida kirjandusest (4, 5, 6, 7, 8). Suurem täpsus on tavaliselt saavutatav samalaadse struktuuriga võrdlusühendite kasutamisel (9).

▼B1.5.3. **Spetsiifilisus***Loksutamismeetod*

Nernsti jaotusseadus kehtib ainult konstantsel temperatuuril, rõhul ja pH-l ning ainult lahjendatud lahustes. See kehtib ainult puhta, kahe puhta lahusti vahel dispergeeritud aine puhul. Kui ühes või mõlemas faasis on samal ajal mitu lahustunud ainet, võib see tulemusi mõjutada.

Lahustunud molekulide dissotsieerumise või assotsieerumisega kaasnevad samuti kõrvalekalded Nernsti jaotusseadusest. Kõrvalekalded väljenduvad sõltuvuse tekkes jaotusteguri ja lahuse kontsentratsiooni vahel.

Paljude tulemust mõjutavate tasakaalude tõttu ei tohiks seda katsemeetodit dissotsieeruvatel ühenditel vastava paranduseta kasutada. Selliste ühendite puhul tuleks kaaluda puhverlahuse kasutamist vee asemel; puhvri pH peaks vähemalt ühe ühiku võrra erinema aine pKa väärtusest ja arvesse tuleks võtta selle pH mõju antud keskkonnale.

1.6. **MEETODI KIRJELDUS**1.6.1. **Jaotusteguri esialgne hindamine**

Jaotustegurit on eelistatav hinnata arvutuslikult (vt liidet 1) või testaine lahustuvuse suhte põhjal puhastes lahustites (10).

1.6.2. **Loksutamismeetod**1.6.2.1. *Lahustite ettevalmistamine*

Oktanool: jaotusteguri määramisel tuleks kasutada analüüsipuhast lahustit.

Vesi: kasutada tuleks vett, mis on bidestillieeritud klaas- või kvartseadmes. Dissotsieeruvate ühendite puhul tuleks vee asemel kasutada puhverlahuseid, juhul kui see on õigustatud.

Märkus

Otse ioonvahetist pärinevat vett kasutada ei tohi.

1.6.2.1.1. **Lahustite eelküllastamine**

Enne jaotusteguri määramist tuleks lahustitesüsteemi faasid katsetemperatuuril loksutada üksteise suhtes küllastada. Praktiline lahendus selleks on panna analüüsipuhast oktanool ja vesi kumbki suures pudelis piisava koguse teise lahustiga 24 tunniks mehaanilisele loksutile ja lasta neil seejärel seista faaside eraldumise ja küllastumiseni.

▼B

1.6.2.1.2. Katseks valmistumine

Kahefaasilise süsteemi kogumaht peaks katseanuma peaaegu täielikult täitma. See aitab vältida kadusid lendumise kaudu. Kasutatavate mahtude suhe ja ainekogused sõltuvad järgmistest asjaoludest:

— esialgselt hinnangulisest jaotusteguri väärtusest (vt eespool);

— analüüsiks vajalikust minimaalsest testaine kogusest ning

— kontsentratsioonipiirangust 0,01 mol/l kummaski faasis.

Sooritatakse kolm katset. Esimeses kasutatakse arvutatud oktanooli-vee suhet, teises jagatakse see suhe kahega ja kolmandas korrutatakse see suhe kahega (nt 1:1, 1:2, 2:1).

1.6.2.1.3. Testaine

Valmistatakse põhilahus veega eelküllastatud oktanoolis. Põhilahuse kontsentratsioon tuleks enne selle jaotusteguri mõõtmisel kasutamist täpselt kindlaks määrata. Lahust tuleks säilitada tingimustes, mis tagavad selle stabiilsuse.

1.6.2.2. Katsetingimused

Katsetemperatuuri tuleks hoida konstantsena (± 1 °C) ja see peaks jääma vahemikku 20–25 °C.

1.6.2.3. Mõõtmisprotseduur

1.6.2.3.1. Jaotustasakaalu saavutamine

Kõigi katsetingimuste jaoks tuleks kahes eksemplaris ette valmistada vajalikud mõlema lahusti kaalutised koos vajaliku koguse põhilahusega.

Oktanoolifaase tuleks mõõta mahu järgi. Katseanumaid tuleks loksutada kas sobival loksutil või käsitsi. Tsentrifuugiklaasi kasutamisel on seda soovitatav kiiresti 180° ümber oma risttelje pöörata, nii et sissejäänud õhk tõuseb läbi mõlema faasi. Kogemused on näidanud, et tavaliselt piisab jaotustasakaalu saavutamiseks 50 sellisest pöördest. Kindluse mõttes on soovitatav rakendada 100 pööret viie minuti jooksul.

1.6.2.3.2. Faaside eraldamine

Vajaduse korral tuleks segu faaside eraldamiseks tsentrifuugida. Seda tuleks teha toatemperatuuril hoitavas laboritsentrifuugis; mittetermostateeritava tsentrifuugi kasutamisel tuleks tsentrifuugiküvette enne analüüsi vähemalt tund aega tasakaalustada.

▼B1.6.2.4. *Analüüs*

Jaotusteguri määramiseks tuleb määrata testaine kontsentratsioonid mõlemas faasis. Selleks võib võtta kindla koguse lahust iga katsenõu mõlemast faasist ja analüüsida neid vastavalt valitud meetodile. Arvutada tuleks mõlemas faasis oleva aine koguhulka ja võrrelda seda alguses süsteemi viidud kogusega.

Proovide võtmisel veefaasist tuleks kasutada meetodit, mille puhul oktanolifaasi jälgede proovi sattumise oht on minimaalne, näiteks klaassüstlalt eemaldatava nõelaga. Süstal peaks algul olema osaliselt õhuga täidetud. Nõela viimisel läbi oktanolikihi tuleks õhk õrnalt välja suruda. Küllaldane kogus veefaasi tõmmatakse süstlasse. Süstal tõmmatakse kiirelt lahusest välja ja nõel eemaldatakse. Süstla sisu võib seejärel veefaasi proovina kasutada. Kontsentratsioonid eraldatud faasides tuleks eelistatavalt määrata spetsiifiliste määramismetodite abil. Sobida võivad näiteks järgmised analüüsimeetodid:

— fotomeetrilised meetodid;

— gaaskromatograafia;

— kõrge eraldusvõimega vedelikkromatograafia.

1.6.3. **HPLC meetod**1.6.3.1. *Ettevalmistused**Seade*

Vajalik on pulseerimisvaba pumba ja sobiva detektoriga vedelikkromatograaf. Soovitav on kasutada silmusega sisestamisklappi. Polaarsete rühmade esinemine statsionaarses faasis võib HPLC kolonni efektiivsust oluliselt vähendada. Seetõttu peaks polaarsete rühmade sisaldus statsionaarses faasis olema minimaalne (11). Kasutada võib müügil olevaid mikrogranulaarseid pöördfaasilisi täidiseid või valmiskolonne. Sisestamissüsteemi ja analüüsikolonna vahel võib olla kaitsekolonn.

Liikuvfaas

Elueerimislahusti valmistatakse HPLC-puhtast metanoolist ja HPLC-puhtast veest ning see degaseeritakse enne kasutamist. Kasutada tuleks isokraatilist elueerimist. Veesisaldus metanooli-vee liikuvfaasides peaks olema vähemalt 25 %. Tavaliselt piisab ühendite, mille $\log P = 6$, elueerimiseks ühe tunni jooksul 1 ml/min voolukiiruse juures metanooli-vee suhtest 3:1 (mahu järgi). Kõrge $\log P$ -ga ühendite (ja võrdlusühendite) puhul võib olla vaja retentsiooniga lühendada, vähendades selleks liikuva faasi polaarsust või kolonni pikkust.

Oktanoolis väga madala lahustuvusega ühenditel kaldub HPLC meetodi kohaselt leitud $\log P_{OW}$ väärtus olema ebaharilikult madal; selliste ühendite piigid elueeruvad vahel koos lahusti frondiga. See on tõenäoliselt tingitud asjaolust, et jaotumisprotsess on liiga aeglane, saavutamaks normaalse kestusega HPLC eraldamise jooksul tasakaalu. Usaldusväärse väärtuse saamiseks võib sellisel juhul abi olla voolukiiruse vähendamisest ja/või metanooli-vee suhte alandamisest.

▼ B

Katse- ja võrdlusühendite lahustuvus liikuv faasis peab olema küllaldane nende tuvastamiseks. Metanooli-vee segus võib lisandeid kasutada ainult erandjuhtudel, kuna lisandid muudavad kolonni omadusi. Lisanditega kromatogrammide tegemisel tuleb kasutada teist sama tüüpi kolonni. Kui metanooli-vee eluent ei sobi, võib kasutada muid orgaanilise lahusti ja vee segusid, nt etanooli-vee või atsetonitriili-vee segu.

Dissotsieeruvate ühendite puhul on eluendi pH kriitilise tähtsusega. See peaks jääma kolonni töövahemikku, mis on tavaliselt 2–8. Soovitatav on kasutada puhverlahust. Hoolikalt tuleks vältida soolade sadestumist ja kolonni omaduste halvenemist, mida tuleb ette mõninate orgaanilise faasi/puhverlahuse segude puhul. HPLC määramisi ei ole silikageelil põhinevate statsionaarsete faasidega pH väärtustel üle 8 soovitatav teha, kuna aluseline liikuv faas võib kolonni omadusi järsult halvendada.

Lahustunud ained

Võrdlusühendid peaksid olema võimalikult kõrge puhtusastmega. Uuritavad ja kalibreerimisel kasutatavad ühendid lahustatakse võimaluse korral liikuv faasis.

Katsetingimused

Temperatuur ei tohiks mõõtmiste käigus kõikuda rohkem kui ± 2 K.

1.6.3.2. **Mõõtmine***Surnud aja t_0 arvutamine*

Surnud aega t_0 võib määrata kas homoloogilise rea (nt alküülmetüülketoonid) või kolonnis mittepeetuvate orgaaniliste ühendite (nt tiourea, formamiid) abil. Surnud aja arvutamiseks homoloogilise rea abil süstitakse kolonni vähemalt seitse homoloogilise rea liiget ja määratakse vastavad retentsiooniajad. Töötlemata retentsiooniaja väärtused $t_{r(n_c + 1)}$ esitatakse $t_{r(n_c)}$ funktsioonina ja leitakse järgmise regressioonivõrrandi lõikepunkt a ja tõus b :

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

(n_c = süsinikuaatomite arv). Surnud aeg t_0 leitakse seejärel järgmisest valemist:

$$t_0 = a/(1-b)$$

▼B*Kaliibrimisgraafik*

Järgmise etapina koostatakse sobivate võrdlusühendite log k *versus* log P korrelatsioonikõver. Praktikas süstitakse ühel ajal 5–10 võrdlusühendit, mille log P jääb eeldatavasse log P vahemikku, ja määratakse retentsiooniajad, eelistatavalt detektorsüsteemiga ühendatud meerikuga integraatori abil. Arvutatakse vastavad logaritmilised mahtuvustegurite väärtused log k ja esitatakse graafiliselt nende sõltuvus loksutamismeetodil leitud log P väärtustest. Kaliibrimine tehakse regulaarsete ajavahemike tagant, vähemalt kord päevas, et võtta arvesse võimalikke kolonni efektiivsuse muutusi.

Testaine mahtuvusteguri määramine

Testaine süstitakse võimalikult väikese liikuvfaasi kogusega. Määratakse retentsiooniaeg (soovitavalt kahe paralleelmääramisena), võimaldades nii arvutada mahtuvustegurit k. Seejärel saab võrdlusühendite korrelatsioonigraafiku põhjal interpoleerida testaine jaotusteguri. Väga kõrgete ja väga madalate jaotustegurite korral tuleb väärtus ekstrapoleerida. Sellisel juhul tuleb hoolikalt silmas pidada regressioonisirge usalduspiiri.

2. **ANDMED***Loksutamismeetod*

Määratud log P väärtuste usaldatavust saab kontrollida topeltmääramiste tulemuste keskmise võrdlemisel üldise keskmisega.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);
- kui kumbki meetod ei ole kohaldatav (nt pindaktiivsete ainete puhul), tuleks esitada arvutuslikult leitud väärtus või hinnanguline väärtus, mis on leitud üksikute lahustuvuste põhjal oktaanolis ja vees);
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid, eriti lisandeid ja aine füüsikalist olekut käsitlevad andmeid ja märkusi.

Loksutamismeetodi puhul:

- esialgse hinnangulise määramise tulemust, kui see leiti;
- määramistemperatuuri;
- kontsentratsioonide määramisel kasutatud analüüsiprotseduuride andmeid;
- tsentrifuugimise kestust ja kiirust, kui seda kasutati;

▼B

- mõlemas faasis igal määramisel leitud kontsentratsioonid (st kokku 12 kontsentratsiooni väärtust);
- testaine massi, mõlema faasi mahtu igas katseanumas ja pärast tasakaalustamist kummaski faasis oleva testaine summaarset arvutuslikku kogust;
- iga katsetingimuste kogumi kohta tuleks esitada jaotusteguri (P) arvutuslikult leitud väärtused ning nende keskmine, samuti kõigi määramiste keskmine. Kui on märke jaotusteguri kontsentratsioonisõltuvusest, tuleks see aruandes ära märkida;
- esitada tuleks üksikute P väärtuste standardhälve nende keskvaartusest;
- kõigi määramiste keskmine P väärtus tuleks esitada ka kümnendlogaritmina;
- arvutuslikku teoreetilist P_{OW} väärtust, kui selline väärtus määrati või kui mõõdetud väärtus on suurem kui 10^4 ;
- katses kasutatud vee ja veefaasi pH-d;
- puhvrite kasutamisel nende vee asemel kasutamise põhjendust, nende koostist, kontsentratsiooni ja pH väärtust ning veefaasi pH väärtust enne ja pärast katset.

HPLC meetodi puhul:

- esialgse hinnangulise määramise tulemust, kui see leiti;
- test- ja võrdlusaineid ja nende puhtust;
- määramiste temperatuurivahemikku;
- pH-d, mille juures määramised tehti;
- andmeid analüüsi- ja kaitsekolonni, liikuva faasi ja kasutatud detektori kohta;
- kalibrimisel kasutatud võrdlusühendite retentsiooniandmeid ja kirjanduses esitatud log P väärtusi;
- sobitatud regressioonisirge (log k versus log P) andmeid;
- katseühendi keskmisi retentsiooniandmeid ja interpoleeritud log P väärtust;
- seadmete ja töötingimuste kirjeldust;
- elueerimisprofiile;
- kolonni viidud test- ja võrdlusainete koguseid;
- surnud aega ja selle määramise meetodit.

▼B

4. **VIITED**
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-Nygård, 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 Laboratoriumspraxis (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, 1 459.
 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. 16,1 207.
 18. W.B. Neely, D.R. Branson and G.E. Blau, Environ. Sci. Technol., 1974, vol. 8, 1 113.
 19. D.S. Brown and E.W. Flagg, J. Environ. Qual., 1981, vol. 10, 382.
 20. J.K. Seydel and K.J. Schaper, Chemische Struktur und biologische Aktivität von Wirkstoffen, Verlag Chemie, Weinheim, New York 1979.

▼B

21. R. Franke, *Theoretical Drug Design Methods*, Elsevier, Amsterdam 1984,
22. Y.C. Martin, *Quantitative Drug Design*, Marcel Dekker, New York, Basel 1978.
23. N.S. Nirrlees, S.J. Noulton, C.T. Murphy, P.J. Taylor; *J. Med. Chem.*, 1976, vol. 19, 615.

▼B*1. liide***Arvutus-/hindamismeetodid****SISSEJUHATUS**

Üldise arvutusmeetodite tutvustuse, vastavaid andmeid ja näiteid võib leida raamatust „Handbook of Chemical Property Estimation Methods” (a).

Arvutuslikke P_{OW} väärtusi saab kasutada

- sobiva katsemeetodi valikul (loksutamismeetod: $\log P_{OW}$ vahemikus –2 kuni 4, HPLC meetod: $\log P_{OW}$ vahemikus 0–6);
- sobivate katsetingimuste valikul (näiteks võrdlusainete valikul HPLC protseduurideks, oktanooli/vee suhte valikul loksutamismeetodi puhul);
- labori sisekontrollimeetodina võimalike katsevigade avastamiseks;
- hinnangulise P_{OW} väärtuse saamiseks juhtudel, mille puhul katsemeetodeid tehnilistel põhjustel rakendada ei saa.

HINDAMISMEETOD

Jaotusteguri esialgne hindamine Jaotusteguri hinnangulise väärtuse võib leida testaine lahustuvuse põhjal puhastes lahustites.

Selleks:

$$P_{\text{estimate}} = \frac{\text{saturation } c_{n\text{-octanol}}}{\text{saturation } c_{\text{water}}}$$

ARVUTUSMEETODID*Arvutusmeetodite põhimõte*

Kõigi arvutusmeetodite kohaselt jagatakse molekul sobivateks alamstruktuuri-deks, mille kohta on olemas usaldusväärsed $\log P_{OW}$ osaväärtused. Seejärel arvutatakse terve molekuli $\log P_{OW}$, liites kokku funktsionaalrühmadele vastavad osaväärtused ja sisemolekulaarseid vastasmõjusid arvestavad parandusliikmed.

Rühmakonstantide ja parandusliikmete väärtusi võib leida toodud allikatest (b, c, d, e). Mõnda allikat ajakohastatakse regulaarselt (b).

Kvaliteedinõuded

Üldjuhul arvutusmeetodi usaldusväärsus väheneb uuritava ühendi keerukuse kasvades. Madala molaarmassiga lihtsate, ühe või kahe funktsionaalrühmaga molekulide puhul on eeldatav vahe erinevate, funktsionaalrühmade osaväärtusi arvestavate meetodite abil leitud ning mõõdetavate $\log P_{OW}$ väärtuste vahel 0,1–0,3 ühikut. Keerukamate molekulide puhul võib veapiir olla suurem. See sõltub nii saadaval olevate rühmakonstantide usaldusväärsusest kui ka oskusest hinnata sisemolekulaarseid vastasmõjusid (nt vesiniksidemeid) ja kasutada vastavaid parandusliikmeid (viimane probleem ei ole arvutitarkvara CLOGP-3 kasutamisel eriti oluline) (b). Dissotsieeruvate ühendite puhul on oluline arvestada õigesti dissotsiatsiooniastet ja vastava iooni laengut.

▼ B**Arvutuskäik***Hansch'i π -meetod*

Algne hüdrofoobse asendaja konstant π , mille võtsid kasutusele Fujita jt (f), määratletakse järgmiselt:

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

kus $P_{OW}(\text{PhX})$ on aromaate derivaadi jaotustegur ja $P_{OW}(\text{PhH})$ lähteaine jaotustegur.

$$\text{(e.g. } \pi_{Cl} = \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}) - \log P_{ow}(\text{C}_6\text{H}_6) = 2,84 - 2,13 = 0,71\text{)}.$$

Vastavalt määratlusele on π -meetod kohaldatav peamiselt aromaatsetele asendus-saadustele. Paljude asendajate π -väärtused on esitatud koondtabelitena (b, c, d). Neid kasutatakse aromaatsete molekulide või alamstruktuuride $\log P_{OW}$ arvutamisel.

Rekkeri meetod

Rekkeri (g) järgi arvutatakse $\log P_{OW}$ väärtus järgmiselt:

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

kus f_i tähistab erinevaid rühmakonstante ja a_i nende esinemissagedust uuritavas molekulis. Parandusliikmed võib väljendada summaarselt konstandi C_m (nn maagilise konstandi) korrutisena. Rühmakonstandid f_i ja C_m leiti mitme muutujaga regressioonanalüüsi abil 825 ühendi 1 054 eksperimentaalse P_{OW} väärtuse põhjal (c, h). Vastasmõju arvestavad liikmed määratakse vastavalt kirjanduses toodud eeskirjadele (e, h, i).

Hansch'i-Leo meetod

Hansch'i ja Leo (c) järgi arvutatakse $\log P_{OW}$ väärtus järgmiselt:

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

kus f_i tähistab erinevaid rühmakonstante, F_j parandusliikmeid ja a_i , b_j vastavaid esinemissagedusi. Paljude eksperimentaalsete P_{OW} väärtuste põhjal koostati katse-eksituse meetodil aatomite ja funktsionaalrühmade osaväärtuste ning parandusliikmete F_j (nn faktorite) nimekiri. Parandusliikmed on jagatud mitmesse eri klassi (a, c). Kõigi reeglite ja parandusliikmete arvestamine on suhteliselt keerukas ja aeganõudev. Selleks otstarbeks on välja töötatud vastavad tarkvarapaketid (b).

Kombineeritud meetod

Keerukate molekulide $\log P_{OW}$ arvutamise täpsust on oluliselt võimalik suurendada, kui jagada molekul suuremateks alamstruktuurideks, mille kohta on olemas usaldusväärsed $\log P_{OW}$ väärtused kas tabelites (b), (c) või on need saadud isiklikel mõõtmistel. Selliseid fragmente (nt heterotsükkleid, antrakinooni, asobenseeni) võib seejärel kombineerida Hansch'i π -väärtuste või Rekkeri või Leo rühmakonstantidega.

Märkused

- i) Osaliselt või täielikult dissotsieerunud ühendite saab arvutusmeetodeid kohaldada ainult juhul, kui on võimalik arvestada vajalikke parandustegureid.

▼B

- ii) Kui võib eeldada sisemolekulaarsete vesiniksidemete olemasolu, tuleb vastavad parandusliikmed liita (ligikaudu + 0,6 kuni + 1,0 log P_{OW} ühikut)
 - (a). Viiteid selliste sidemete olemasolu kohta võib leida molekuli ruumilistest mudelitest või spektroskoopilistest andmetest.
- iii) Kui võimalik on mitu tautomeerset vormi, kasutatakse arvutustes kõige suurema tõenäosusega vormi.
- iv) Hoolikalt tuleks jälgida muudatusi rühmakonstantide tabelites.

Aruanne

Arvutus-/hindamismeetodite kasutamisel peaks katsearuanne võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

- aine kirjeldust (segu, lisandid jne);
- märkeid võimalike sisemolekulaarsete vesiniksidemete, dissotsiatsiooni, laengu ja mis tahes muude ebaharilike nähtuste kohta (nt tautomeeria);
- arvutusmeetodi kirjeldust;
- märkeid kasutatud andmebaasi kohta või andmebaasi ennast;
- lahknevusi tavapärasest fragmentide valikust;
- põhjalikku arvutusdokumentatsiooni.

KIRJANDUS

- 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, Pharmacology Library, Elsevier, New York, 1977, vol. 1.
- h) C.V. Eadsforth, P. Moser, Chemosphere, 1983, vol. 12,1459.
- i) R.A. Scherrer, ACS, American Chemical Society, Washington D.C., 1984, Symposium Series 255, p. 225.

▼B

2.liide

Soovitavad võrdlusained HPLC meetodi puhul

Nr	Võrdlusaine	log P _{OW}	pK _a
1	2-butanoon	0,3	
2	4-atsetüülpüridiin	0,5	
3	Aniliin	0,9	
4	Atseetaniliid	1,0	
5	Bensüülalkohol	1,1	
6	p-metoksüfenool	1,3	pK _a = 10,26
7	Fenoksüüädikhape	1,4	pK _a = 3,12
8	Fenool	1,5	pK _a = 9,92
9	2,4-dinitrofenool	1,5	pK _a = 3,96
10	Bensonitriil	1,6	
11	Fenüülatsetonitriil	1,6	
12	4-metüülbensüülalkohol	1,6	
13	Atsetofenoon	1,7	
14	2-nitrofenool	1,8	pK _a = 7,17
15	3-nitrobensoehape	1,8	pK _a = 3,47
16	4-kloroaniliin	1,8	pK _a = 4,15
17	Nitrobenseen	1,9	
18	Kaneelalkohol	1,9	
19	Bensoehape	1,9	pK _a = 4,19
20	p-kresool	1,9	pK _a = 10,17
21	Kaneelhape	2,1	pK _a = 3,89 cis 4,44 trans
22	Anisool	2,1	
23	Metüülbensoaat	2,1	
24	Benseen	2,1	
25	3-metüülbensoehape	2,4	pK _a = 4,27
26	4-klorofenool	2,4	pK _a = 9,1
27	Trikloroetüleen	2,4	
28	Atrasiin	2,6	
29	Etüülbensoaat	2,6	
30	2,6-diklorobensonitriil	2,6	
31	3-klorobensoehape	2,7	pK _a = 3,82
32	Tolueen	2,7	
33	1-naftool	2,7	pK _a = 9,34
34	2,3-dikloroaniliin	2,8	
35	Klorobenseen	2,8	
36	Allüülfenüüleeter	2,9	
37	Bromobenseen	3,0	

▼B

Nr	Võrdlusaine	log P _{OW}	pKa
38	Etüülbenseen	3,2	
39	Bensofenoos	3,2	
40	4-fenüülfenool	3,2	pKa = 9,54
41	Tümool	3,3	
42	1,4-diklorobenseen	3,4	
43	Difenüülamiin	3,4	pKa = 0,79
44	Naftaleen	3,6	
45	Fenüülbensoaat	3,6	
46	Isopropüülbenseen	3,7	
47	2,4,6-triklorofenool	3,7	pKa = 6
48	Bifenüül	4,0	
49	Bensüülbensoaat	4,0	
50	2,4-dinitro-6-sec-butüülfenool	4,1	
51	1,2,4-triklorobenseen	4,2	
52	Dodekaanhape	4,2	
53	Difenüüleeter	4,2	
54	Butüülbenseen	4,5	
55	Fenantreen	4,5	
56	Fluoranteen	4,7	
57	Dibensüül	4,8	
58	2,6-difenüülpüridiin	4,9	
59	Trifenüülamiin	5,7	
60	DDT	6,2	
Muud madala log P _{OW} väärtusega võrdlusained			
1	Nikotiinhape	- 0,07	

▼B**A.9. LEEKPUNKT****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katse tegemiseks on kasulik teada aine süttivust. Katsemeetod sobib vedelikele, mille aurud võivad süüteallika abil süttida. Siintoodud katsemeetodid annavad usaldusväärseid tulemusi ainult iga meetodi puhul märgitud leekpunkti vahemikus.

Kasutatava meetodi valikul tuleks arvestada keemiliste reaktsioonide võimalusega aine ja proovianuma vahel.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Leekpunkt on madalaim, normaalrõhule 101,325 kPa normaliseeritud temperatuur, mille juures eraldub vedelikust katsemeetodis määratletud tingimustel aine sellises koguses, et katseanumas tekib süttiv auru/õhu segu.

Ühikud: °C

$$t = T - 273,15$$

(t (°C) ja T (K))

1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Aine viiakse katseanumasse ja soojendatakse või jahutatakse iga meetodi puhul kirjeldatud protseduuri kohaselt katsetemperatuurini. Veendumaks, kas proov katsetemperatuuril süttib või mitte, tehakse süttamiskatsed.

1.5. KVALITEEDINÕUDED**1.5.1. Korratavus**

Korratavus varieerub vastavalt leekpunkti vahemikule ja kasutatavale katsemeetodile; maksimum on 2 °C.

1.5.2. Tundlikkus

Tundlikkus sõltub kasutatavast katsemeetodist.

1.5.3. Spetsiifilisus

Osade katsemeetodite spetsiifilisus piirdub kindlate leekpunkti vahemikega ja sõltub ainespetsiifilistest omadustest (nt kõrge viskoossus).

▼B

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Ettevalmistused**

Testaine proov viiakse punktidele 1.6.3.1 ja/või 1.6.3.2 vastavasse katseseadmesse.

Ohutuse huvides on kõrge siseenergiaga või mürgiste ainete puhul soovitatav kasutada väikest proovikogust, u 2 cm³, kasutavaid meetodeid.

1.6.2. **Katsetingimused**

Kui see ei ole vastuolus ohutusnõuetega, tuleks katseseade paigaldada tõmbevabasse asukohta.

1.6.3. **Katse tegemine**1.6.3.1. *Tasakaaluline meetod*

Vt ISO 1516, ISO 3680, ISO 1523, ISO 3679.

1.6.3.2. *Mittetasakaaluline meetod**Abeli seade*

Vt BS 2000, 170. osa, NF M07-011, NF T66-009.

Abel-Pensky seade

Vt EN 57, DIN 51755, 1. osa (temperatuuridele 5–65 °C), DIN 51755, 2. osa (temperatuuridele alla 5 °C), NF M07-036.

Tagi seade

Vt ASTM D 56.

Pensky-Martensi seade

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

Märkused

Kui mittetasakaalulise meetodiga (1.6.3.2) määratud leekpunkt on 0 ± 2 °C, 21 ± 2 °C või 55 ± 2 °C, tuleb saadud tulemust kinnitada sama seadmega ja tasakaalulise meetodi abil.

Teavitamiseks võib kasutada ainult meetodeid, mille abil saab määrata leekpunkti temperatuuri.

Viskoosete, lahusteid sisaldavate vedelike (värvid, kummid jms) leekpunkti määramiseks võib kasutada ainult viskoosete vedelike leekpunkti määramiseks ette nähtud seadmeid ja katsemeetodeid.

Vt ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213, 1. osa.

▼B

2. **ANDMED**

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);
- kasutatud meetodit ja võimalikke kõrvalekaldeid sellest;
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid andmeid ja lisamärkusi.

4. **VIITED**

Puuduvad.

▼B**A.10. SÜTTIVUS (TAHKED AINED)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katse tegemiseks on kasulik teada aine võimalikku plahvatusohtlikkust.

Käesolevat katset tuleks kasutada ainult pulbriliste, teraliste või pastataoliste ainete puhul.

Et mitte hõlmata kõiki süttivaid aineid, vaid ainult kiiresti põlevaid või eriti ohtlike põlemisomadustega aineid, loetakse väga tuleohtlikuks ainult neid aineid, mille põlemiskiirus ületab teatava piirväärtuse.

Eriti ohtlik võib olla hõõgumise levik läbi metallipuru, kuna see raskendab tule kustutamist. Metallipulbrid tuleks lugeda väga tuleohtlikuks, kui hõõgumisprotsess levib teatava aja jooksul läbi kogu pulbri massi.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Põlemisaeg sekundites.

1.3. VÕRDLUSAINED

Nimetamata.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Ainest moodustatakse umbes 250 mm pikkune katkestusteta pulbri-riba ja tehakse esialgne sõelkatse kontrollimaks, kas gaasileegiga süütamisel levib põlemisprotsess leegi või hõõgumisena edasi. Kui põlemisprotsess levib kindlaksmääratud aja jooksul läbi 200 mm riba, viiakse põlemiskiiruse määramiseks läbi täiemahuline katseprogramm.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Täpsustamata.

▼B

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Esialgne sõelkatse**

Ainest moodustatakse mittesüttivale, mittepoorsele ja madala soojusjuhtivusega alusplaadile umbes 250 mm pikkune, 20 mm laiune ja 10 mm kõrgune katkestusteta pulbririba. Pulbririba ühele otsale suunatakse pulbri süttimiseni või kuni kaheks minutiks (metallide või metallisulamite pulbrite puhul viieks minutiks) vähemalt 5 mm läbimõõduga gaasipõleti leek. Tehakse kindlaks, kas põlemisprotsess läbib neljaminutilise (metallipulbrite puhul 40minutilise) katseaja jooksul 200 mm ribaosa. Kui pulber ei sütti või põlemisprotsess (leek või hõõgumine) ei läbi neljaminutilise (või 40minutilise) katseaja jooksul 200 mm pulbririba, ei loeta ainet väga tuleohtlikuks ja rohkem katseid sellega ei tehta. Kui põlemisprotsess läbib 200 mm pulbririba vähem kui nelja minutiga või metallipulbrite puhul vähem kui 40 minutiga, viiakse läbi allpool kirjeldatud protseduur (punkt 1.6.2 ja järgmised punktid).

1.6.2. **Põlemiskiiruse katse**1.6.2.1. *Ettevalmistused*

250 mm pikk, kolmnurkse läbilõikega, 10 mm sisemise kõrguse ja 20 mm sisemise laiusega vorm täidetakse tihendamata pulbrilise või teralise ainega. Vormi kummalegi küljele paigaldatakse pikisuunas külgsuunanguteks kaks metallplaati, mis ulatuvad 2 mm üle kolmnurkse vao ülaääre (vt joonist). Vorm kukutatakse seejärel kolm korda 2 cm kõrguselt kõvale aluspinnale. Vajaduse korral täidetakse vorm seejärel uuesti. Külgmised piirangud eemaldatakse ja liigne aine kaabitakse ära. Vormi peale paigaldatakse seejärel mittesüttiv, mittepoorne ja madala soojusjuhtivusega alusplaat, keeratakse vorm koos plaadiga ümber ja eemaldatakse vorm.

Pastataolistest ainetest moodustatakse mittesüttivale, mittepoorsele ja madala soojusjuhtivusega alusplaadile 250 mm pikkune, umbes 1 cm² läbilõikepindalaga riba.

1.6.2.2. *Katsetingimused*

Niiskustundlike ainete puhul tehakse katse võimalikult kiiresti pärast aine hoiunõust eemaldamist.

1.6.2.3. *Katse tegemine*

Riba paigutatakse tõmbekapi alla õhu liikumise suunaga risti.

Õhu liikumise kiirus peab olema piisav, takistamaks suitsu levikut laborisse, ning seda tuleb katse jooksul konstantsena hoida. Seadme ümber tuleks paigaldada tõmbevari.

Riba üks ots süüdatakse vähemalt 5 mm läbimõõduga gaasipõleti leegi abil. Kui riba on 80 mm ulatuses põlenud, mõõdetakse järgneva 100 mm kestel põlemiskiirus.

▼B

Katset korratakse kuus korda, iga kord puhta jaheda alusplaadiga, välja arvatud juhul, kui ühel katsel on juba saadud positiivne tulemus.

2. ANDMED

Hindamisel on vajalikud esialgse sõelkatse (1.6.1) põlemisaeg ja kuni kuuel põhikatsel (1.6.2.3) leitud lühim põlemisaeg.

3. ARUANDLUS**3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);
- katseaine kirjeldust, füüsilist olekut ja niiskusesisaldust;
- esialgse sõelkatse ja põlemiskiiruse katse tulemusi (kui see tehti);
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärke.

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

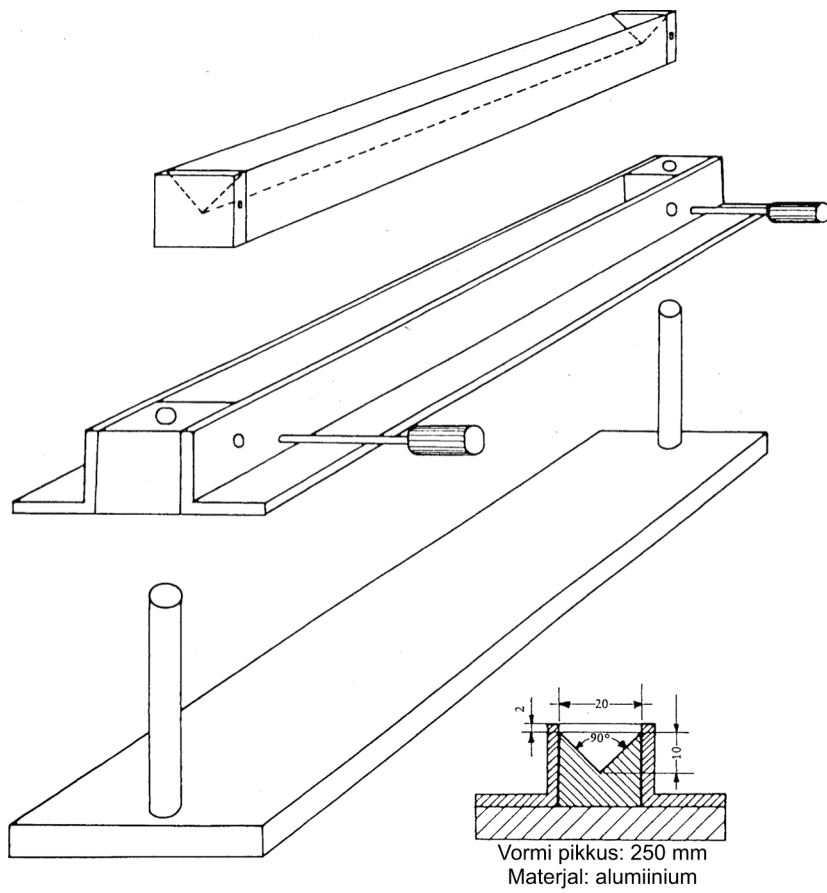
Pulbrilised, teralised või pastataolised ained loetakse väga tuleohtlikuks, kui nende põlemisaeg punktis 1.6.2 kirjeldatud mis tahes katseprotseduuris on alla 45 sekundi. Metallide või metallisulamite pulbrid loetakse väga tuleohtlikuks juhul, kui need süttivad ja leek või reaktsioonivöönd levib kümne minutiga või kiiremini üle kogu proovi.

4. VIITED

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

▼B*Liide**Joonis***Põlemisriba valmistamise vorm ja abivahendid**

(Kõik mõõdud on millimeetrites)



▼B**A.11. SÜTTIVUS (GAASID)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

See meetod võimaldab määrata õhuga segunenud gaaside süttivust toatemperatuuril (u 20 °C) ja atmosfäärirõhul ning süttivate gaaside puhul kontsentratsioonivahemikku, milles nad süttivad. Järjest suurenevate kontsentratsioonidega katsegaasi-õhu segudes tekitatakse elektrisäde ja jälgitakse, kas gaas süttib.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Süttimispiirkond on kontsentratsioonivahemik alumise ja ülemise plahvatuspiiri vahel. Alumine ja ülemine plahvatuspiir on piirkontsentratsioonid, mille puhul leek õhuga segatud gaasis ei levi.

1.3. VÕRDLUSAINED

Nimetamata.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Gaasi kontsentratsiooni õhus suurendatakse järk-järgult ja igas etapis tekitatakse segus elektrisäde.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Täpsustamata.

1.6. MEETODI KIRJELDUS**1.6.1. Seade**

Katseanumaks on kummuli klaasilinder sisediameetriga vähemalt 50 mm ja kõrgusega vähemalt 300 mm. 3–5 mm vahekaugusega süüteelektroodid paigutatakse 60 mm kõrgusele silindri põhjast. Silindril on survepääsuklapiga ava. Plahvatuskahjustuste vältimiseks tuleb seade varjestada.

Süüteallikana kasutatakse püsivat 0,5 s kestusega induktsioonisädet, mis tekitatakse 10–15 kV väljundpingega kõrgepingetrafo (maksimaalne sisendvõimsus 300 W) abil. Sobivat seadet on näiteks kirjeldatud viites 2.

1.6.2. Katsetingimused

Katse viiakse läbi toatemperatuuril (u 20 °C).

▼B1.6.3. **Katse tegemine**

Doseerpumpade abil viiakse klaasilindrisse kindla kontsentratsiooniga gaasi-õhu segu. Segus tekitatakse säde ja jälgitakse, kas süüteallikast eraldub leek ja levib gaasis iseseisvalt. Gaasikontsentratsiooni muudetakse 1 % kaupa kuni eespool kirjeldatud süttimise toimumiseni.

Kui gaasi keemiline struktuur viitab mittesüttivusele ja on võimalik välja arvutada stõhhiomeetrilise gaasiõhu segu koostis, siis kontrollitakse selliste 1 % astmetega ainult segusid kontsentratsioonivahemikus 10 % alla ja 10 % üle stõhhiomeetrilise kontsentratsiooni.

2. **ANDMED**

Ainus selle omaduse määramisel oluline teave on leegi levimine.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);
- kasutatud seadme kirjeldust koos mõõtmetega;
- katsetemperatuuri;
- katsekontsentratsioone ja saadud tulemusi;
- katse tulemust: mittesüttiv gaas või väga tuleohtlik gaas;
- kui järeldatakse, et gaas on mittesüttiv, tuleks ära märkida kontsentratsioonivahemik, milles seda 1 % sammude kaupa testiti;
- registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamise seonduvad andmed ja märkused.

4. **VIITED**

1. NF T 20-041 (September 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. SÜTTIVUS (KOKKUPUUTEL VEEGA)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Meetodi abil saab kontrollida, kas aine reaktsioonil vee või niiske õhuga tekib ohtlikus koguses gaasi või gaase, mis võivad olla väga tuleohtlikud.

Katsemeetod on kohaldatav nii tahketele kui ka vedelatele ainetele. Meetod ei ole kohaldatav ainetele, mis kokkupuutel õhuga iseeneslikult süttivad.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Väga tuleohtlik: ained, mis kokkupuutel vee või niiske õhuga eraldavad ohtlikus koguses väga tuleohtlikke gaase kiirusega vähemalt 1 liiter/kg kohta tunnis.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Ainet kontrollitakse vastavalt allpool esitatud etapiviisilisele eeskirjale; kui mis tahes etapis leiab aset süttimine, pole edasine kontrollimine vajalik. Kui on teada, et aine veega ägedalt ei reageeri, jätkatakse 4. etapiga (1.3.4).

1.3.1. 1. etapp

Testaine viiakse 20 °C destilleeritud vett sisaldavasse süvendisse ja kontrollitakse, kas tekkiv gaas süttib.

1.3.2. 2. etapp

Testaine kantakse 20 °C destilleeritud vett sisaldavas tassis ujuvale filterpaberile ja kontrollitakse, kas tekkiv gaas süttib. Filterpaberi ainus ülesanne on ainet koos hoida ja süttimise tõenäosust suurendada.

1.3.3. 3. etapp

Testainest moodustatakse ligikaudu 2 cm kõrgune ja 3 cm läbimõõduga kuhi. Kuhjale lisatakse mõned tilgad vett ja kontrollitakse, kas tekkiv gaas süttib.

1.3.4. 4. etapp

Testaine segatakse 20 °C destilleeritud veega ja mõõdetakse seitsme tunni jooksul ühetunniste vahedega gaasi eraldumise kiirust. Kui gaas eraldub ebaühtlase kiirusega või kiirus kasvab veel seitsme tunni pärast, pikendatakse mõõtmisaega kuni viie päevani. Kui kiirus ületab mis tahes ajahetkel 1 liitri/kg kohta tunnis, võib katse peatada.

▼B

1.4. VÕRDLUSAINED

Nimetamata.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Täpsustamata.

1.6. MEETODITE KIRJELDUS

1.6.1. **1. etapp**1.6.1.1. *Katsetingimused*

Katse tehakse toatemperatuuril (u 20 °C).

1.6.1.2. *Katse tegemine*

Väike (ligikaudu 2 mm läbimõõduga) kogus testainet viiakse destilleeritud vett sisaldavasse süvendisse. Kontrollitakse, kas i) eraldub gaasi ja ii) kas gaas süttib. Kui gaas süttib, pole edasine uurimine vajalik, kuna aine loetakse ohtlikuks.

1.6.2. **2. etapp**1.6.2.1. *Seade*

Mis tahes sobivas nõus, näiteks 100 mm läbimõõduga aurustuskaasis, asetatakse destilleeritud vee pinnale filterpaber.

1.6.2.2. *Katsetingimused*

Katse tehakse toatemperatuuril (u 20 °C).

1.6.2.3. *Katse tegemine*

Väike (ligikaudu 2 mm läbimõõduga) kogus testainet kantakse filterpaberi keskohta. Kontrollitakse, kas i) eraldub gaasi ja ii) kas gaas süttib. Kui gaas süttib, pole edasine uurimine vajalik, kuna aine loetakse ohtlikuks.

1.6.3. **3. etapp**1.6.3.1. *Katsetingimused*

Katse tehakse toatemperatuuril (u 20 °C).

1.6.3.2. *Katse tegemine*

Testainet moodustatakse ligikaudu 2 cm kõrgune ja 3 cm läbimõõduga kuhi süvendiga tipus. Auku lisatakse mõned tilgad vett ja kontrollitakse, kas i) eraldub gaasi ja ii) kas gaas süttib. Kui gaas süttib, pole edasine uurimine vajalik, kuna aine loetakse ohtlikuks.

▼ B1.6.4. **4. etapp**1.6.4.1. *Seade*

Katseseade valmistatakse vastavalt joonisele.

1.6.4.2. *Katsetingimused*

Kontrollida, kas testaine hoiuanumas leidub < 500 µm suuruseid osakesi sisaldavat pulbrit. Kui sellise pulbri sisaldus koguhulgas on üle 1 % mahu järgi või kui materjal on pude, tuleks kogu aine enne katsetusi pulbriks jahvatada, et arvestada osakeste suuruse vähendamisega ladustamisel ja käitlemisel; vastasel juhul uuritakse ainet töötlemata kujul. Katse tuleks teha toatemperatuuril (u 20 °C) ja atmosfäärirohul.

1.6.4.3. *Katse tegemine*

Seadme tilklehtrisse viiakse 10–20 ml vett ja seadme koonilisse kolbi viiakse 10 g ainet. Eralduva gaasi ruumala mõõdetakse mis tahes sobiva meetodiga. Tilklehtri kraan avatakse, nii et vesi pääseb koonilisse kolbi, ja käivitatakse stopper. Gaasi eraldumise kiirust mõõdetakse seitsme tunni jooksul ühetunniste vahedega. Kui gaasi eraldumise kiirus on selle aja kestel ebahühtlane või kasvab veel selle ajavahemiku lõpus, pikendatakse mõõtmisaega kuni viie päevani. Kui gaasi eraldumise kiirus ületab mis tahes ajahetkel 1 liitri/kg kohta tunnis, võib katse peatada. Tuleks teha kolm paralleelkatset.

Kui ei ole teada, mis gaasiga on tegemist, tuleks seda analüüsida. Kui gaas sisaldab väga tuleohtlikke komponente ja ei ole teada, kas summaarne segu on väga tuleohtlik, tuleb valmistada sama koostisega segu ja kontrollida seda vastavalt meetodile A.11.

2. **ANDMED**

Aine loetakse ohtlikuks kui

— mis tahes katsetapis leiab aset iseeneslik süttimine

või

— eraldub tuleohtlikke gaase kiirusega vähemalt 1 liiter/kg aine kohta tunnis.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);

— testaine ettevalmistamise andmeid;

▼B

- katsete tulemusi (1., 2., 3. ja 4. etapp);
- eralduva gaasi keemilist koostist;
- 4. etapi (1.6.4) käigus gaasi eraldumise kiirust;
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärke.

4.

VIITED

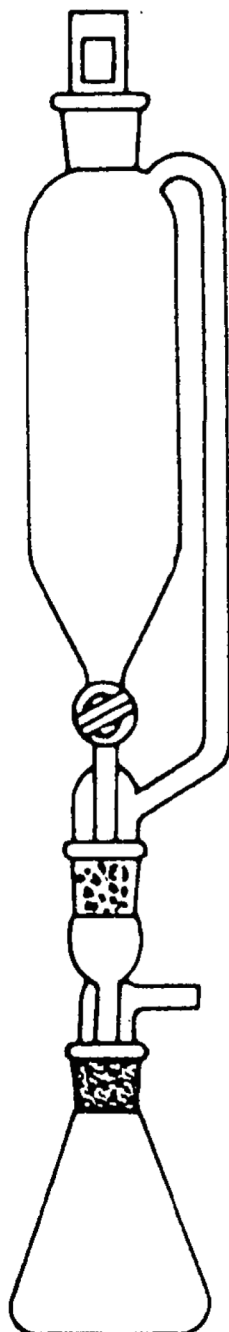
1. Recommendations on the transport of dangerous goods, test and criteria, 1990, United Nations, New York.
2. NF T 20-040 (September 85). Chemical products for industrial use. Determination of the flammability of gases formed by the hydrolysis of solid and liquid products.

▼ B

Liide

Joonis

Seade



▼B**A.13. TAHKETE AINETE JA VEDELIKE ISESÜTTIVUS****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katsemeetod on kohaldatav tahketele ja vedelatele ainetele, mis väikestes kogustes toatemperatuuril (u 20 °C) õhuga kokku puutudes lühikese aja jooksul iseeneslikult süttivad.

Katsemeetod ei hõlma aineid, mis peavad iseeneslikuks süttimiseks toatemperatuuril või kõrgemal temperatuuril õhuga kokku puutuma mitu tundi või päeva.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Ained loetakse isesüttivateks, kui need süttivad või söestuvad punktis 1.6 kirjeldatud tingimustel.

Vedelike isesüttivust võib vaja olla kontrollida ka meetodi A.15 „Isesüttimistemperatuur (vedelikud ja gaasid)” kohaselt.

1.3. VÕRDLUSAINED

Nimetamata.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Tahke aine või vedelik kantakse inertssele tugiainele ja viiakse toatemperatuuril viieks minutiks kokkupuutesse õhuga. Kui vedelik sellistes tingimustes ei sütti, imetakse see filterpaberisse ja viiakse toatemperatuuril (u 20 °C) viieks minutiks kokkupuutesse õhuga. Kui tahke aine või vedelik süttib või kui vedelik süütab või söestab filterpaberi, loetakse aine isesüttivaks.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Korratavus: kuna ohutus on oluline, loetakse aine isesüttivaks juba siis, kui üks tulemus on positiivne.

1.6. MEETODI KIRJELDUS**1.6.1. Seade**

Umbes 10 cm läbimõõduga portselantass täidetakse toatemperatuuril (u 20 °C) umbes 5 mm kõrguselt diatomiitmullaga.

Märkus

Diatomiitmulla või mis tahes muu saadaval oleva võrreldava inertse ainega simuleeritakse mulda, millesse testaine õnnetusjuhtumi korral võib voolata.

Inertsel kandjal õhuga kokku puutudes mittesüttivate vedelike testimiseks on vaja filterpaberit.

▼B1.6.2. **Katse tegemine**a) *Pulbrilised tahked ained*

1–2 cm³ uuritavat pulbrit valatakse u 1 m kõrguselt mittesüttivale pinnale ja jälgitakse, kas aine süttib kukkumisel või mahalangemisest viie minuti jooksul.

Katset korratakse kuus korda, kui aine enne ei sütti.

b) *Vedelikud*

U 5 cm³ uuritavat vedelikku valatakse ette valmistatud portselantassi ja jälgitakse, kas aine süttib viie minuti jooksul.

Kui aine kuue katse jooksul ei sütti, tuleb teha järgmised katsed:

0,5 ml testaine proov viiakse süstla abil sälgustatud filterpaberile ja jälgitakse, kas filterpaber süttib või söestub viie minuti jooksul vedeliku lisamisest. Katset korratakse kolm korda, kui paber enne ei sütti ega söestu.

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE KÄSITLEMINE

Katsed võib peatada kohe pärast positiivse tulemuse saamist mis tahes katses.

2.2. HINDAMINE

Kui aine süttib viie minuti jooksul pärast inertsse tugiainele kandmist ja õhu kätte viimist või kui vedelik süütab või söestab filterpaberi viie minuti jooksul pärast lisamist ja õhu kätte viimist, loetakse aine isesüttivaks.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- aine täpset kirjeldust (koostist ja lisandeid);
- katsete tulemusi;
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärke.

4. **VHITED**

1. NF T 20-039 (September 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. PLAHVATUSOHTLIKKUS****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Meetod näeb ette katseskeemi, mille abil kontrollitakse, kas tahke või pastataoline aine on plahvatusohtlik kokkupuutel leegiga (terminaalne tundlikkus), löögi või hõõrdumise mõjul (mehaaniline tundlikkus) ja kas vedelik on leegi või löögi mõjul plahvatusohtlik.

Meetod koosneb kolmest osast:

- a) terminaalsete tundlikkuse katse (1);
- b) mehaanilise tundlikkuse katse löögi suhtes (1);
- c) mehaanilise tundlikkuse katse hõõrdumise suhtes (1).

Meetodi abil saadakse andmeid teatavate tavapärase mõjuritega seotud plahvatusohtu hindamiseks. Meetod ei ole mõeldud aine plahvatusohtlikkuse kontrollimiseks mis tahes tingimustes.

Meetod sobib ainega seotud plahvatusohtu (terminaalsete ja mehaanilise tundlikkuse) määramiseks konkreetsetel direktiivis täpsustatud tingimustel. Meetodi puhul kasutatakse mitut tüüpi katseseadmeid, mis on laias rahvusvahelises kasutuses (1) ja mis annavad tavaliselt usaldusväärseid tulemusi. On selge, et meetod ei ole ammendav. Kirjeldatud seadmete asemel võib kasutada muid seadmeid eeldusel, et need on rahvusvaheliselt tunnustatud ja tulemused on piisavalt sarnased kirjeldatud seadmetel saadavate tulemustega.

Katseid ei ole vaja teha juhul, kui saadaval olevad termodünaamilised andmed (nt tekkesoojus, lagunemissoojus) ja/või teatavate funktsionaalrühmade (2) puudumine struktuurivalemis tõestavad põhjendatud kahtluseta, et toimeaine ei lagune kiirelt gaaside või soojuse eraldumisega (st materjal ei ole plahvatusohtlik). Mehaanilise tundlikkuse katse hõõrdumise suhtes ei ole vedelike puhul nõutav.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Lõhkeaine

Ained, mis võivad leegi mõjul plahvatada või on kirjeldatud seadmes löögi- või hõõrdetundlikud (või on muus seadmes suurema mehaanilise tundlikkusega kui 1,3-dinitrobenseen).

1.3. VÕRDLUSAINED

1,3-dinitrobenseen, tehniline kristalne saadus, läbib 0,5 mm sõela, hõõrdumis- ja löögimeetoditele.

Perhüdro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triasiin (RDX, heksogeen, tsükloniit, CAS-i nr 121-82-4), kristallitud tsükloheksanooni vesilahusest, märgsõelutud läbi 250 µm sõela ja kinni peetud 150 µm sõelal, kuivatatud neli tundi 103 ± 2 °C juures, hõõrdumis- ja löögikatsete teise seeria jaoks.

▼B

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Eelkatsed on vajalikud kolme tundlikkuskatse tarvis ohutute tingimuste määramiseks.

1.4.1. **Käsitlemisohutuse katsed (3)**

Ohutuse huvides rakendatakse väga väikestele proovidele (u 10 mg) enne põhikatsete tegemist kuumutamist gaasileegis vabas õhus, lööke mis tahes tavapärastes seadmetes ja hõõrdumist vasara ja alasi vahel või mis tahes muus hõõrdumisseadmes. Selle eesmärk on kontrollida, kas aine on nii tundlik ja plahvatusohtlik, et ettenähtud tundlikkuskatsetel, eriti termilise tundlikkuse katsetel, tuleb katse tegija vigastamise vältimiseks kasutada erilisi ettevaatusabinõusid.

1.4.2. **Termiline tundlikkus**

Meetodi puhul kuumutatakse ainet erinevas läbimõõdus düüsidega plaatidega suletud terashülsis, et kontrollida, kas aine võib tugeva kuumuse ja piiratud ruumala tingimustes plahvatada.

1.4.3. **Mehaaniline tundlikkus (löögitundlikkus)**

Meetodi puhul antakse ainele kindlalt kõrguselt kukutatud kindla massiga löök.

1.4.4. **Mehaaniline tundlikkus (hõõrdetundlikkus)**

Meetodi puhul mõjutatakse tahkeid ja pastataolisi aineid standardisel pinnal määratud koormuse ja suhtelise liikumise abil tekitatud hõõrdumisega.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Täpsustamata.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Termiline tundlikkus (leegi mõju)**1.6.1.1. *Seade*

Seade koosneb ühekordselt kasutatavast terashülsist korduvkasutatava sulguriga (joonis 1), mis on paigutatud kaitsvasse kuumutus-seadmesse. Kõik hülsid on valmistatud sügavtõmbamisel lehtterasest (vt liidet) ja on 24 mm sisediameetriga, 75 mm pikad ja 0,5 mm paksuse seinaga. Hülsidel on avatud otsas äärik hülsi sulgemiseks düüsiga plaadiga sulguriseadme abil. Sulgur koosneb keskel asuva düüsiga survekindlast plaadist, mis kaheosalise keermega liitmiku (mutter ja keermega võru) abil kindlalt hülsi külge kinnitatakse. Mutter ja keermega võru on valmistatud kroom-mangaanterasest (vt liidet), mis on sädemevaba kuni temperatuurini 800 °C. Düüsiga plaadid on 6 mm paksud, valmistatud kuumuskindlast terasest (vt liidet) ja neid on mitmesuguse avasuurusega.

▼B1.6.1.2. *Katsetingimused*

Tavaliselt uuritakse ainet töötlemata kujul, kuid mõningatel juhtudel, nt kui see on kokku pressitud, vormi valatud või muul moel tihendatud, võib olla vaja see enne katsetusi purustada.

Tahkete ainete puhul määratakse katsetes kasutatav ainekogus kahe- või kolmeastmelisel proovitäitmisel. Kaalutud hülss täidetakse 9 cm³ ainega ja tambitakse kogu hülssi ristlõike ulatuses avaldatava 80 N jõuga kokku. Ohutuse huvides või juhtudel, kus proovi füüsikaline olek võib surve mõjul muutuda, võib kasutada muid täitmismeetodeid; nt väga hõõrdetundliku aine puhul ei saa tampimist kasutada. Kui ainet on võimalik kokku suruda, lisatakse veel ainet ja jätkatakse tampimist, kuni hülss on täidetud 55 mm kauguseni üläärest. Määratakse hülssi 55 mm tasemeni täitmiseks vajalik ainekogus ja lisatakse veel kaks lisakogust, mis kumbki 80 N jõuga tampimisel tihendatakse. Seejärel ainet vastavalt vajadusele kas lisatakse ja tambitakse või eemaldatakse, nii et hülss täitub 15 mm kõrguseni üläärest. Järgmiseks tehakse teine proovitäitmine, alustades tambitud ainekogusega, mis moodustab kolmandiku esimesel proovitäitmisel leitud kogumassist. Lisatakse veel kaks lisakogust, mis 80 N jõuga tampimisel tihendatakse, ja ainekogus reguleeritakse lisamis- või eemaldamisel 15 mm kõrguseni üläärest. Teisel proovitäitmisel leitud ainekogust kasutatakse edasistes katsetes, täites hülssi kolmes võrdses osas, mis surutakse kokku ruumalani 9 cm³ mis tahes selleks vajaliku jõuga. (Selleks võib abivahendina kasutada vaherõngaid).

Vedelikud ja geelid viiakse hülssi 60 mm kõrguseni, vältides geelide puhul hoolikalt õhuvahede teket. Keermega võru libistatakse altpoolt hülssi peale, paigaldatakse sobiv düüsiga plaat ja keeratakse mutter pärast moolübedeendisulfiidmäärde lisamist kinni. Väga oluline on kontrollida, et ainet ei jääks ääriku ja plaadi või keermete vahele.

Kuumutamisel kasutatakse propaani rõhuregulaatori (60–70 mbar) ja voolumõõturiga tööstuslikust balloonest, millest gaas jagatakse jaotustoru kaudu ühtlaselt (kontrollitakse visuaalselt põletite leekide järgi) nelja põleti vahel. Põletid asetsevad ringikujuliselt ümber katsekambri, nagu on näidatud joonisel 1. Kolme põleti kogukulu on umbes 3,2 liitrit propaani minutis. Kasutada võib muid küttegaase ja põleteid, kuid kuumutamise kiirus peab vastama joonisel 3 täpsustatule. Kõigi seadmete puhul tuleb kuumutamise kiirust regulaarselt kontrollida, kasutades selleks dibutüülfalaadiga täidetud hülssi, nagu on näidatud joonisel 3.

1.6.1.3. *Katsete tegemine*

Iga katset sooritatakse hülssi purunemiseni või viie minuti möödumiseni kuumutamise algusest. Plahvatusega lõppenuks loetakse katse, mille tulemusel hülss puruneb kolmeks või enamaks tükiks, mis võivad omavahel olla kitsaste metalliribadega ühendatud, nagu on näha joonisel 2. Väiksema arvu tükkidega või purunemiseta lõppenud katset plahvatusega lõppenuks ei loeta.

▼B

Alguses tehakse kolm katset 6,0 mm düüsiga plaadiga ja kui plahvatust ei toimu, tehakse teine kolmene katseseeria 2,0 mm düüsiga plaadiga. Kui kummaski katseseerias plahvatust ei toimu, pole edasised katsed vajalikud.

1.6.1.4. *Hindamine*

Katse loetakse positiivseks, kui kummaski eespool nimetatud katseseerias toimub plahvatus.

1.6.2. **Mehaaniline tundlikkus (löögitundlikkus)**1.6.2.1. *Seade (joonis 4)*

Tüüpilise kukkuvate vasaraga seadme põhiosa on valuterasest plokk aluse, alasi, posti, juhttrööbaste, kukkuvate raskuste, päästiku ja proovianumaga. 100 mm (läbimõõt) × 70 mm (kõrgus) terasalasi on kruvitud 230 mm (pikkus) × 250 mm (laius) × 200 mm (kõrgus) terasplokile valatud 450 mm (pikkus) × 450 mm (laius) × 60 mm (kõrgus) alusele. Tõmmatud terastorust liitekohtadeta post on kinnitatud terasploki tagaküljel olevasse fiksaatorisse. Seade on nelja kruviga ankurdatud monoliitsele 60 × 60 × 60 cm betoonplokile nii, et juhttrööpad on täiesti püstsuunalised ja kukkuv raskus langeb vabalt. Kasutada saab nii 5 kg kui ka 10 kg monoliitset terasest raskusi. Iga raskuse löökpea on valmistatud karastatud terasest, HRC 60–63, ja selle miinimumläbimõõt on 25 mm.

Uuritav proov on suletud löögiseadmesse, mis koosneb kahest koaksiaalsest, üksteise kohal paiknevast monoliitset terassilindrist õõnsas silindrilises terasjuhtvõrus. Monoliitsed terassilindrid peaksid olema läbimõöduga 10 (– 0,003, – 0,005) mm ja kõrgusega 10 mm ning poleeritud pinna, ümarate nurkadega (kõverusraadius 0,5 mm) ja kõvadusega HRC 58–65. Õõnessilindril peab olema 16 mm välisdiameeter, poleeritud 10 (+ 0,005, + 0,010) mm sisediameeter ja 13 mm kõrgus. Vahealasil (läbimõõt 26 mm ja kõrgus 26 mm) on paigaldatud terasest löögiseade, mille keskosas on tekkivaid gaase läbi laskva perforatsiooniga rõngas.

1.6.2.2. *Katsetingimused*

Proov peaks olema mahuga 40 mm³ või muule seadmele sobiva mahuga. Tahkeid aineid tuleks uurida kuivana ja need ette valmistada järgmiselt:

- a) pulbrilised ained sõelutakse (sõela ava 0,5 mm) ja katses kasutatakse kogu sõela läbinud osa;
- b) kokku pressitud, vormi valatud või muul moel tihendatud materjalid purustatakse väiksemateks tükkideks ja sõelutakse; katses kasutatakse sõelumisel saadud fraktsiooni osakeste läbimõöduga 0,5–1 mm ja see fraktsioon peab esindama töötlemata algainet.

Tavaliselt pastadena tarnitavaid materjale tuleks võimaluse korral uurida kuivana või vähemalt eemaldada eelnevalt võimalikult suur osa lahjendist. Vedelikke testitakse 1 mm vahega alumise ja ülemise terassilindri vahel.

▼B1.6.2.3. *Katsete tegemine*

Tehakse kuuest katsest koosnev katseeria, kukutades 10 kg raskust 0,40 m kõrguselt (40 J). Kui kuue katse jooksul 40 J juures toimub plahvatus, tuleb teha järgmine kuue katsega katseeria, kukutades 5 kg raskust 0,15 m kõrguselt (7,5 J). Muudes seadmetes võrreldakse proovi tunnustatud meetodi (nt üles-alla tehnika jne) abil valitud võrdlusainega.

1.6.2.4. *Hindamine*

Katse tulemus loetakse positiivseks, kui vähemalt ühel korral toimub kirjeldatud katseadmetega mis tahes katse plahvatus (põlema lahvamine ja/või paugatused on plahvatusega samaväärsed) või kui proov osutub muus löögikatses tundlikumaks kui 1,3-dinitrobenseen või RDX.

1.6.3. **Mehaaniline tundlikkus (hõõrdetundlikkus)**1.6.3.1. *Seade (joonis 5)*

Hõõrdeseade koosneb valatud terasest alusplaadist, millele on paigaldatud hõõrdeseade. Viimane koosneb fikseeritud portselanpulgast ja liikuvast portselanplaadist. Portselanplaat asub kahel juhtrööpal jooksval kelgul. Kelk on ühendusvarda, ekstsentrilise nuki ja sobiva ülekande abil ühendatud elektrimootoriga nii, et portselanplaati liigutatakse portselanpulga all ainult üks kord 10 mm ulatuses edasi-tagasi. Portselanpulgale rakendatav jõud võib olla 120–360 N.

Tasased portselanplaadid on valmistatud valgest tehnilisest portselanist (jämedusega 9–32 µm) ja nende mõõtmed on 25 mm (pikkus) × 25 mm (laius) × 5 mm (kõrgus). Silindriline portselanpulk on samuti valmistatud valgest tehnilisest portselanist ja on 15 mm pikk, 10 mm läbimõõduga ja karestatud ümarate otsapindadega, mille kõverusraadius on 10 mm.

1.6.3.2. *Katsetingimused*

Proov peaks olema mahuga 10 mm³ või muule seadmele sobiva mahuga.

Tahkeid aineid uuritakse kuivana ja nad valmistatakse ette järgmiselt:

- a) pulbrilised ained sõelutakse (sõela ava 0,5 mm) ja katses kasutatakse kogu sõela läbinud osa;
- b) kokku pressitud, vormi valatud või muul moel tihendatud materjalid purustatakse väiksemateks tükkideks ja sõelutakse; katses kasutatakse sõelumisel saadud fraktsiooni osakeste läbimõõduga < 0,5 mm.

Tavaliselt pastadena tarnitavaid materjale tuleks võimaluse korral uurida kuivana. Kui pastast ei ole kuiva ainet võimalik valmistada, testitakse pastat (eemaldades eelnevalt võimalikult suur osa lahjendist) 0,5 mm paksuse, 2 mm laiuse ja 10 mm pikkuse, šablooni abil tekitatud kihina.

▼B1.6.3.3. *Katsete tegemine*

Portselanpulk viiakse uuritava proovi kohale ja rakendatakse koormus. Katse ajal peavad karedad jooned portselanplaadil olema liikumissuunaga risti. Tuleb jälgida, et pulk toetuks proovile, et pulga all oleks küllaldane kogus testainet ja et plaat pulga all õigesti liiguks. Pastataolised ained kantakse plaadile 0,5 mm paksuse, 2 × 10 mm avaga šablooni abil. Portselanplaat peab portselanpulga all 0,44 sekundi jooksul 10 mm edasi ja tagasi liikuma. Iga plaadi ja pulga pinna osa võib kasutada ainult ühe korra; pulga mõlemat otsa võib kasutada kaheks katseks ja plaadi kumbagi külge kolmeks katseks.

360 N koormusega tehakse kuuest katsest koosnev katseeria. Kui nende kuue katse käigus saadakse positiivne tulemus, tehakse 120 N koormusega veel üks kuuest katsest koosnev katseeria. Muudes seadmetes võrreldakse proovi tunnustatud meetodi (nt üles-alla tehnika jne) abil valitud võrdlusainega.

1.6.3.4. *Hindamine*

Katse tulemus loetakse positiivseks, kui vähemalt ühel korral toimub kirjeldatud katseseadmetega mis tahes katse plahvatus (pragin ja/või paugatused või põlema lahvatamine on plahvatuses samaväärsed) või kui proov vastab muus hõrdekatses võrdväärsetele tingimustele.

2. **ANDMED**

Aine loetakse direktiivi mõistes plahvatusohtlikuks juhul, kui termilise, löögi- või hõrdetundlikkuse katses saadakse positiivne tulemus.

3. **ARUANDLUS**3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- testaine tunnusandmeid, koostist, puhtusastet, niiskusesisaldust jne;
- proovi füüsilist olekut ja seda, kas seda on purustatud ja/või sõelutud;
- termilise tundlikkuse katsetes tehtud tähelepanekuid (nt proovi massi, kildude arvu jne);
- mehaanilise tundlikkuse katsetes tehtud tähelepanekuid (nt suure suitsukoguse teke või täielik lagunemine ilma paugatuste, leekide, sädemete, pragina jne esinemiseta);
- igat tüüpi katsete tulemusi;
- kui kasutatud on muid seadmeid, tuleb esitada teaduslik põhjendus ning tõendid tulemuste vastavuse kohta kirjeldatud seadmetel saadud tulemustega;

▼B

- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid kommentaare, nagu viiteid katsetele analoogsete ainetega;
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärkusi.

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE JA HINDAMINE

Katsearuandes tuleb ära märkida kõik tulemused, mis loeti valeks, anomaalseks või mitterelevantseks. Kui mõnda tulemust ei arvestata, tuleb selle kohta lisada selgitus ja muude või täiendavate katsete tulemused. Kui anomaalsele tulemusele ei leidu seletust, tuleb seda arvestada täisväärtusliku tulemusena ja kasutada aine vastaval liigitamisel.

4. VIITED

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

Liide

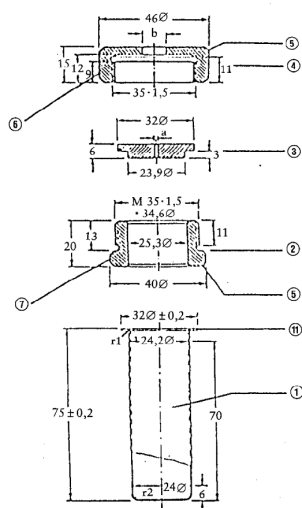
Näitlik materjalide spetsifikatsioon termilise tundlikkuse katseks (vt DIN 1623)

- 1) Hülss: materjalispetsifikatsioon nr 1.0336 505 g
- 2) Düüsiga plaat: materjalispetsifikatsioon nr 1.4873
- 3) Keermega võru ja mutter: materjalispetsifikatsioon nr 1.3817

Joonis 1

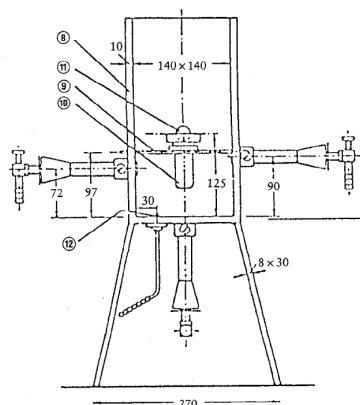
Termilise tundlikkuse katseade

(Kõik mõõdud on millimeetrites)



Joonis 1a. Terashülss ja abivahendid

- (1) hülss
- (1a) välisäärik
- (2) keermega võru, madala hõõrdvusega keere
- (3) düüsiga plaat, läbimõõt $a = 2,0$ või $6,0$ mm
- (4) mutter, läbimõõt $b = 10$ mm
- (5) ümardatud pind
- (6) 2 lamedat osa mutrivõtmele nr 41



Joonis 1b. Kaitsev kuumutusseade

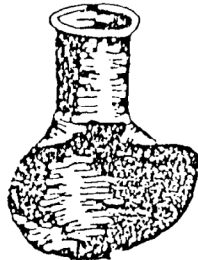
- (7) 2 lamedat osa mutrivõtmele nr 36
- (8) killunemiskindel kest
- (9) 2 tugivarrast hülssile
- (10) komplekteeritud hülss
- (11) tagumise põleti asukoht; ülejäänud põletid on nähtaval
- (12) süüteleek

▼B

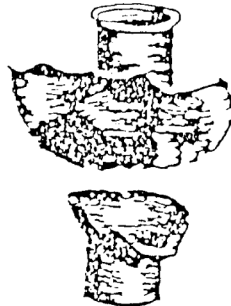
Joonis 2

Termilise tundlikkuse katse

(purunemise näited)



Plahvatuseta purunemine



Plahvatuseta purunemine



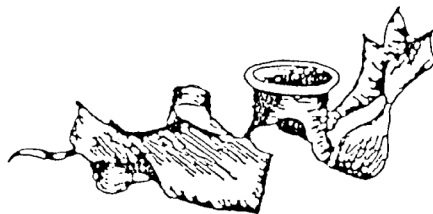
Plahvatusesega purunemine



Plahvatusesega purunemine



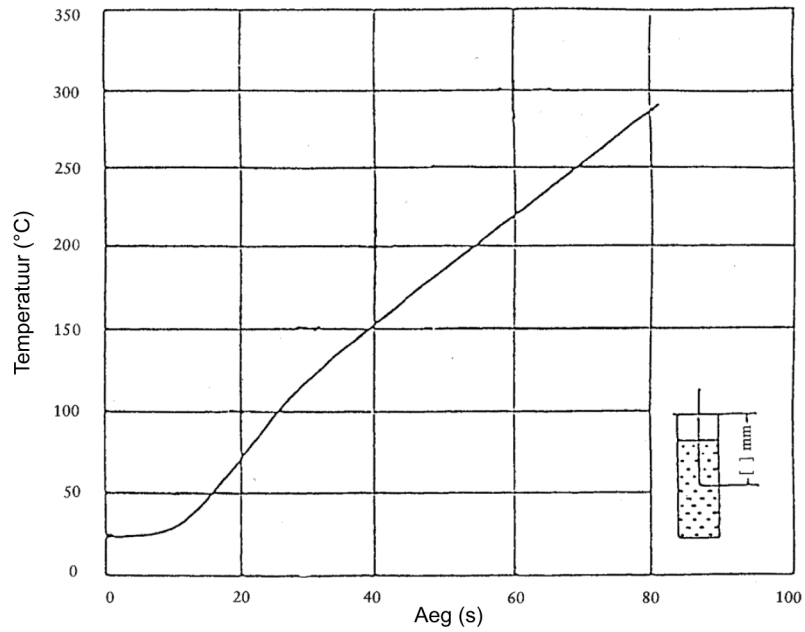
Plahvatusesega purunemine



Plahvatusesega purunemine

▼B

Joonis 3

Kuumutamiskiiruse kaliibrimine termilise tundlikkuse katseks

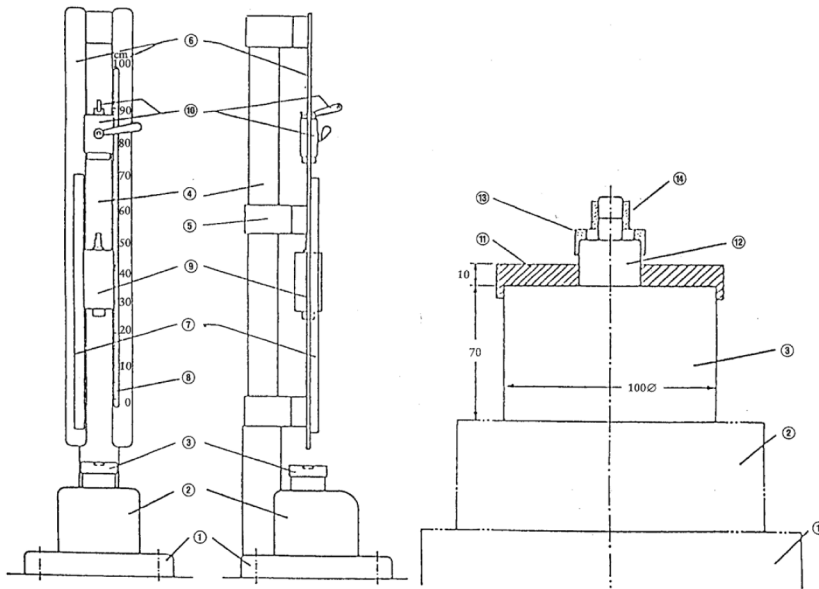
Temperatuuri/aja graafik 27 cm³ dibutüülftalaadi kuumutamisel suletud (1,5 mm düüsiga plaadiga) hülsis propaani voolukiirusel 3,2 l/min. Temperatuur määratakse 1 mm läbimõõduga roostevasest terasest kattega kromellist/alumellist termopaariga, mis on paigutatud mõõteseadme keskele 43 mm allapoole hülsi serva. Kuumutamise kiirus temperatuurivahemikus 135-285 °C peats olema 185-215 K/min.

▼B

Joonis 4

Löögikitse seade

(Kõik mõõdud on millimeetrites)



Joonis 4a. Langev vasar eest ja küljelt, üldvaade

Joonis 4b. Langev vasar, alumine osa

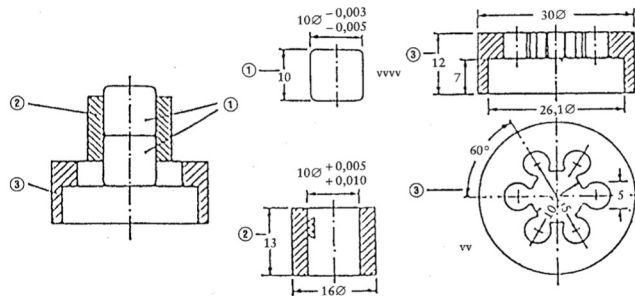
- (1) alus, 450 x 450 x 60
- (2) terasplokk, 230 x 250 x 200
- (3) alasi, 100 (diameeter) x 70
- (4) post
- (5) keskmine põiktala
- (6) 2 juhtrööbast
- (7) hammaslatt

- (8) jaotistega skaala
- (9) langev vasar (langev raskus)
- (10) fiksaator/päästikseade
- (11) juhtplaat
- (12) vahetatav vahealasi, 26 (diameeter) x 26
- (13) düüsidega juhtrõngas
- (14) löögiseade

▼B

Joonis 4

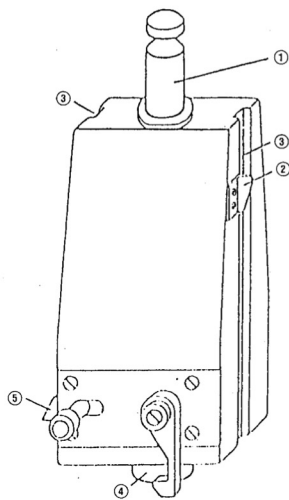
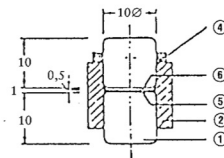
Jätk



Joonis 4c. Löögiseade pulbriliste või pastataoliste ainete jaoks

Joonis 4d. Löögiseade vedelike jaoks

- (1) terassilindrid
- (2) terassilindrite juhtvõru
- (3) düüsidega juhtrõngas
 - a) püstsuunaline läbilõige
 - b) pealtvaade
- (4) kummirõngas
- (5) vedelik (40 mm³)
- (6) vedelikuvaba ruum



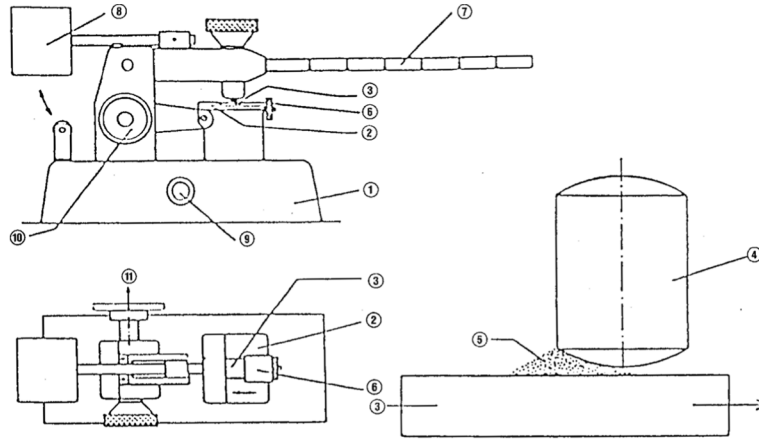
Joonis 4e. Vasar (langev 5 kg raskus)

- (1) riputusnagapulk
- (2) kõrgusemärgis
- (3) fikseeriv soon
- (4) silindriline löökpea
- (5) tagasikäigukonks

▼B

Joonis 5

Hõrdetundlikkuse katseseade



Joonis 5a Hõrdeseade, eestvaade ja pealtvaade

Joonis 5b Pulga algspositsioon proovil

- | | |
|--|---|
| (1) terasalus | (6) pulgahoidja |
| (2) liikuv kelk | (7) koormusõlg |
| (3) portselanplaat, 25 × 25 × 5 mm, kelgul | (8) vastukaal |
| (4) fikseeritud portselanpulk,
10 (diameeter) × 15 mm | (9) lüliti |
| (5) uuritav proov, ligikaudu 10 mm ³ | (10) ratas kelgu algasendisse viimiseks |
| | (11) elektrimootori suund |

▼B**A.15. ISESÜTTIMISTEMPERatuur (VEDELIKUD JA GAASID)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Lõhkeaineid ja tavalisel temperatuuril õhuga kokkupuutel süttivaid aineid ei tohiks selles katses uurida. Katsemeetod on kohaldatav gaasidele, vedelikele ja aurudele, mis õhu juuresolekul kuuma pinnaga kokku puutudes süttivad.

Katalüütilised lisandid, pinnamaterjal või katseanuma suurem maht võivad isesüttimistemperatuuri oluliselt alandada.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Isesüttivuse määra väljendatakse isesüttimistemperatuurina. Isesüttimistemperatuur on madalaim temperatuur, mille juures testaine katsemeetodis määratletud tingimustel õhuga segatuna süttib.

1.3. VÕRDLUSAINED

Võrdlusained on loetletud standardites (vt 1.6.3). Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi toimimise kontrollimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Meetodi kohaselt määratakse kambri siseseina minimaalne temperatuur, mis põhjustab kambrisse süstitud gaasi, auru või vedeliku süttimise.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Korratavus varieerub vastavalt isesüttimistemperatuuri vahemikule ja kasutatavale katsemeetodile.

Tundlikkus ja spetsiifilisus sõltuvad kasutatavast katsemeetodist.

1.6. MEETODI KIRJELDUS**1.6.1. Seade**

Katseseadet kirjeldatakse punktis 1.6.3 viidatud meetodis.

1.6.2. Katsetingimused

Testaine proovi uuritakse punktis 1.6.3 viidatud meetodi kohaselt.

1.6.3. Katse tegemine

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

▼B

2. **ANDMED**

Registreerige katsetemperatuur, atmosfäärirõhk, kasutatud proovikogus ja ajavahemik süttimiseni.

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- aine täpset kirjeldust (tunnusandmeid ja lisandeid);
- kasutatud proovikogust ja atmosfäärirõhku;
- kasutatud katseseadet;
- mõõtmistulemusi (katsetemperatuure, süttimistulemusi ja süttimiseni kulunud ajavahemikke);
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärke.

4. **VIITED**

Puuduvad.

▼B**A.16. TAHKETE AINETE SUHTELINE ISESÜTTIMISTEMPERatuur****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Lõhkeaineid ja tavalisel temperatuuril õhuga kokkupuutel süttivad aineid ei tohiks selles katses uurida.

Katse annab eelteavet tahkete ainete isesüttivuse kohta kõrgematel temperatuuridel.

Kui aine reaktsioonil hapnikuga või eksotermilisel lagunemisel tekkinud soojus ei haju küllalt kiiresti keskkonda, leiab aset isesüttimiseni viiv isekuumenemine. Seega leiab isesüttimine aset siis, kui soojuse tekkekiirus ületab soojuskao kiiruse.

Katse on kasutatav tahkete ainete esialgse sõelkatsena. Arvestades tahkete ainete süttimis- ja põlemisprotsesside keerukust, tuleks selle katsemeetodi abil leitud isesüttimistemperatuuri kasutada ainult võrdlemiseks.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Selle meetodi abil leitud isesüttimistemperatuur on madalaim temperatuur (°C), mille juures kindel ainekogus määratletud tingimustel süttib.

1.3. VÕRDLUSAINE

Puudub.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritava aine kindlaksmääratud kogus viiakse toatemperatuuril ahju ja registreeritakse temperatuuri/aja kõver proovi keskosas ahju temperatuuri tõstmisel kiirusega 0,5 °C/min temperatuurini 400 °C või aine sulamistemperatuurini, kui viimane on madalam. Käesoleva katse kohaselt loetakse isesüttimistemperatuuriks ahju temperatuur, mille juures proovi temperatuur isekuumenemise tulemusel 400 °Cni jõuab.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Puuduvad.

1.6. MEETODI KIRJELDUS**1.6.1. Seade****1.6.1.1. Ahi**

Juhitava temperatuuriga laboriahi (mahuga umbes 2 liitrit), millel on loomulik õhuvahetus ja plahvatuskaitseklapp. Vältimaks võimalikku plahvatusohtu, ei tohi eralduvaid lagunemisaase lasta elektrikütteseadmetega kokku puutuda.

▼ B1.6.1.2. *Traatvõrgust kuubik*

Tükk roostevasest terasest traatvõrku 0,045 mm võrgusilmaga lõigatakse välja vastavalt joonisel 1 toodud skeemile. Võrk volditakse kokku ja kinnitatakse traadiga nii, et tekib avatud ülaosaga kuubik.

1.6.1.3. *Termopaarid*

Kasutatakse sobivaid termopaare.

1.6.1.4. *Meerik*

Sobib mis tahes kahe kanaliga meerik, mis on kaliibritud temperatuurivahemikus 0–600 °C või vastavas pinge vahemikus.

1.6.2. **Katsetingimused**

Aineid uuritakse töötlemata kujul.

1.6.3. **Katse tegemine**

Kuubik täidetakse uuritava ainega ja koputatakse õrnalt, misjärel lisatakse veel ainet, kuni kuubik on täielikult täidetud. Kuubik riputatakse seejärel toatemperatuuril oleva ahju keskele. Temperatuuri registreerimiseks paigutatakse üks termopaar kuubiku keskele ning teine kuubiku ja ahjuseina vahele.

Ahju ja proovi temperatuur registreeritakse pidevalt ahju temperatuuri tõstmisel kiirusega 0,5 °C/min temperatuurini 400 °C või aine sulamistemperatuurini, kui viimane on madalam.

Aine süttimisel näitab proovis olev termopaar temperatuuri järsku tõusu üle ahju temperatuuri.

2. **ANDMED**

Hindamisel on oluline ahju temperatuur, mille juures jõuab proovi temperatuur isekuumenemise tulemusena 400 °Cni (vt joonist 2).

3. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

— uuritava aine kirjeldust;

— mõõtmistulemusi, sh temperatuuri/aja kõverat;

— kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid lisamärke.

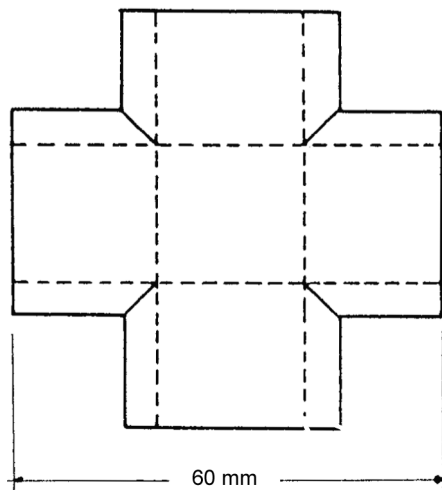
4. **VIITED**

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

▼ B

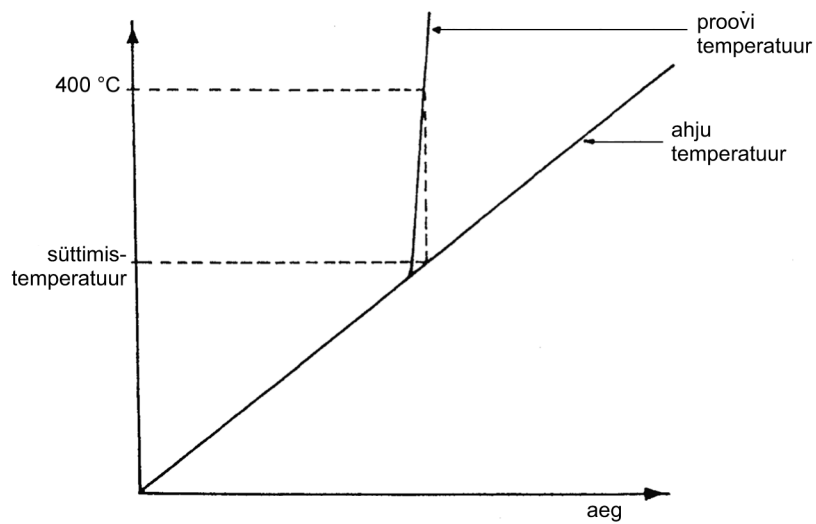
Joonis 1

20 mm katsekuubiku skeem



Joonis 2

Tüüpiline temperatuuri/aja kõver



▼B**A.17. OKSÜDEERIVAD OMADUSED (TAHKED AINED)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katse tegemiseks on kasulik teada aine võimalikku plahvatusohtlikkust.

Katset ei saa kasutada vedelike, gaaside, plahvatusohtlike või väga tuleohtlike ainete ega orgaaniliste peroksiidide puhul.

Katset ei ole vaja teha juhul, kui toimeaine struktuurivalemi kontrollimisel ei jää põhjendatud kahtlust, et toimeaine reageerib põleva materjaliga eksotermiliselt.

Kontrollimaks, kas katse tegemisel tuleks kasutada erilisi ettevaatusabinõusid, tuleks teha eelkatse.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Põlemisaeg: reaktsiooniaeg (sekundites), mis kulub reaktsioonivõõndi levikuks piki kuhilat vastavalt punktis 1.6 kirjeldatud protseduurile.

Põlemiskiirus: väljendatakse millimeetrites sekundi kohta.

Suurim põlemiskiirus: suurim põlemiskiiruse väärtus, mis on mõõdetud 10–90 % oksüdeerijasisaldusega (massi järgi) segudes.

1.3. VÕRDLUSAINE

Võrdlusainena kasutatakse nii katses kui ka eelkatses analüüsipuhast baariumnitraati.

Võrdlussegu on selline punkti 1.6 kohaselt valmistatud baariumnitraadi ja pulbertselluloosi segu, millega saavutatakse suurim põlemiskiirus (tavaliselt 60 % baariumnitraadi sisaldusega (massi järgi) segu).

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Ohutuse huvides tehakse eelkatse. Kui eelkatse näitab selgelt, et testainel on oksüdeerivad omadused, pole edasine kontrollimine vajalik. Vastupidisel juhul tehakse aine kohta täiemahuline katseprogramm.

Täiemahulises katseprogrammis segatakse uuritavast ainest ja kindlaksmääratud põlevast ainest mitmesugustes vahekordades segusid. Igast segust tehakse seejärel kuhi ja süüdatakse see ühest otsast. Leitud suurimat põlemiskiirust võrreldakse võrdlussegu suurima põlemiskiirusega.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Vajaduse korral võib kasutada mis tahes peenestamis- ja segamismeetodeid eeldusel, et kuues eraldi katses määratud suurimad põlemiskiirused ei erine aritmeetilisest keskmisest rohkem kui 10 %.

▼B

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Ettevalmistused**1.6.1.1. *Testaine*

Uuritava proovi osakeste suurust vähendatakse järgmisel meetodil alla 0,125 mm: testaine sõelutakse, seejärel peenestatakse sõelale jäänud osa ja korratakse protseduuri senikaua, kuni kogu proov on sõela läbinud.

Kasutada võib kvaliteedinõuetele vastavaid mis tahes peenestamis- ja sõelumismeetodeid.

Enne segu valmistamist kuivatatakse ainet 105 °C juures konstantse massi saavutamiseni. Kui uuritava aine lagunemistemperatuur on alla 105 °C, kuivatatakse aine sobival madalamal temperatuuril.

1.6.1.2. *Põlevaine*

Põlevainena kasutatakse pulbertselluloosi. Tselluloos peaks olema õhukese kihi kromatograafias või kolonnkromatograafias kasutatavat tüüpi. Sobivaks on osutunud tselluloositüüp, mille kiupikkused jäävad 85 % ulatuses vahemikku 0,020–0,075 mm. Tselluloosipulber sõelutakse läbi 0,125 mm avasuurusega sõela. Kogu katse kestel tuleb kasutada samast partiist pärit tselluloosi.

Enne segu valmistamist kuivatatakse pulbertselluloosi 105 °C juures konstantse massi saavutamiseni.

Kui eelkatses kasutatakse puidutolmu, valmistatakse okaspuu puidutolmu ette järgmiselt: kogutakse fraktsioon, mis läbib 1,6 mm avasuurusega sõela, segatakse tolmu põhjalikult ja kuivatatakse seda neli tundi 105 °C juures kõige rohkem 25 mm paksuses kihis. Tolmu jahutatakse ja suletakse kuni kasutamiseni õhukindlalt võimalikult täis mahutisse; soovitatav on tolmu kasutada 24 tunni jooksul kuivatamisest.

1.6.1.3. *Süüteallikas*

Süüteallikana tuleks kasutada vähemalt 5 mm läbimõõduga gaasipõleti kuuma leeki. Muu süüteallika kasutamisel (nt katse tegemisel inertses atmosfääris) tuleks esitada selle kirjeldus ja kasutamise põhjendus.

1.6.2. **Katse tegemine***Märkus*

Oksüdeerijate segusid tselluloosi või puidutolmuga tuleb vaadelda potentsiaalselt plahvatusohtlikuna ja käsitleda nõutava ettevaatusega.

1.6.2.1. *Eelkatse*

Kuivatatud aine segatakse hoolikalt kuivatatud tselluloosi või puidutolmuga vahekorras kaks osa testainet ühe osa tselluloosi või puidutolmu kohta ja tehakse segust väike koonusekujuline kuhi mõõtudega 3,5 cm (aluse läbimõõt) × 2,5 cm (kõrgus), täites selleks ilma tampimata koonusekujulise vormi (nt suletud põhjaga laborilehtri).

▼B

Kuhi asetatakse mittesüttivale, mittepoorsele ja madala soojusjuhtivusega alusplaadile. Katse tehakse tõmbekapis vastavalt kirjeldusele punktis 1.6.2.2.

Süüteallikas viiakse vastu kuhilat. Jälgitakse järgneva reaktsiooni tugevust ja kestust ning see registreeritakse.

Kui reaktsioon on tugev, loetakse aine oksüdeerivaks.

Kui tulemused on kaheldavad, tehakse allpool kirjeldatud täiemahuline katseprogramm põlemisribaga.

1.6.2.2. Põlemisribakatse

Valmistatakse 10 % kaupa kasvava oksüdeerijasisaldusega oksüdeerija/tselluloosi segud, mis sisaldavad 10–90 % oksüdeerijat (massi järgi). Piiripealsetel juhtudel tuleks suurima põlemiskiiruse täpsemaks mõõtmiseks kasutada vahepealsete kontsentratsioonidega oksüdeerija/tselluloosi segusid.

Kuhi tekitatakse vormi abil. Vorm on metallist, 250 mm pikk ja kolmnurkse läbilõikega, 10 mm sisemise kõrguse ja 20 mm sisemise laiusena. Vormi kummalegi küljele paigaldatakse pikisuunas külgpüreteks kaks metallplaati, mis ulatuvad 2 mm üle kolmnurkse vao ülemise ääre (vt joonist). Seade täidetakse mõningases liias seguga, ilma seda tihendamata. Vorm kukutatakse seejärel 2 cm kõrguselt tugevale aluspinnale ja allesjäänud üleliigne aine tõmmatakse viltuse paberilehega pealt ära. Külgmised piirded eemaldatakse ja allesjäänud pulbrit silutakse rulliga. Vormi peale paigaldatakse seejärel mittesüttiv, mittepoorne ja madala soojusjuhtivusega alusplaat, keeratakse vorm koos plaadiga ümber ja vorm eemaldatakse.

Riba paigutatakse tõmbekapi alla õhu liikumise suunaga risti.

Õhu liikumiskiirus peab olema piisav, et takistada suitsu levikut laborisse, ning seda tuleb katse jooksul konstantsena hoida. Seadme ümber tuleks paigaldada tõmbevari.

Tselluloosi ja mõnede uuritavate ainete hügrooskoopsuse tõttu tuleb katse teha võimalikult kiiresti.

Riba üks ots süüdatakse leegi abil.

Pärast seda, kui reaktsioonivöönd on levinud esimesed 30 mm, mõõdetakse järgneva 200 mm ulatuses reaktsiooni leviku aeg.

Katse tehakse võrdlusainega ja vähemalt korra kõigi testaine/-tselluloosi segudega.

Kui leitav suurim põlemiskiirus ületab oluliselt võrdlussegu põlemiskiirust, võib katse peatada; muul juhul korratakse katset viis korda, kasutades kolme suurima põlemiskiirusega segu.

▼B

Kui arvatakse, et positiivne tulemus on ekslik, korratakse katset sama suurte osakestega inertse ainega, näiteks diatomiidiga tselluloosi asemel. Katset võib korrata ka kõrgeima põlemiskiirusega testaine/tselluloosi seguga inertses atmosfääris (hapnikusisaldus < 2 % mahu järgi).

2. **ANDMED**

Ohutuse huvides loetakse uuritava aine oksüdeerivaid omadusi iseloomustavaks suuruseks suurim põlemiskiirus, mitte selle keskmine väärtus.

Hindamise seisukohast on oluline antud seguga kuuest katsest koosnev seerias saadud suurim põlemiskiiruse väärtus.

Koostatakse graafik, mis näitab iga segu põlemiskiiruse suurima väärtuse sõltuvust oksüdeerija kontsentratsioonist. Graafikult loetakse suurim põlemiskiirus.

Kuus ühes katstes suurima põlemiskiirusega segu mõõtmisel saadud põlemiskiiruse väärtust ei tohi aritmeetilisest keskmisest erineda rohkem kui 10 %, vastasel korral tuleb peenestamis- ja segamismetodeid täiustada.

Leitud suurimat põlemiskiirust võrreldakse võrdlussegu suurima põlemiskiirusega (vt 1.3).

Kui katse tehakse inertses atmosfääris, võrreldakse suurimat reaktsioonikiirust võrdlussegu vastava näitajaga inertses atmosfääris.

3. **ARUANNE**

3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- testaine tunnusandmeid, koostist, puhtusastet, niiskusesisaldust jne;
- proovi mis tahes käitlemist (nt peenestamist, kuivatamist jne);
- katsetes kasutatud süüteallikat;
- mõõtmiste tulemusi;
- reaktsiooni tüüpi (nt kiire põlemine pinnal, põlemine kogu massis, mis tahes andmeid põlemissaaduste kohta jne);
- kõiki tulemuste tõlgendamist mõjutavaid märkusi, sh eelkatstes test- ja võrdlusainega tekkinud reaktsiooni tugevuse kohta (leegiga, sädemetega, suitsuga, hõõgumisega reaktsioon jne) ning nii test- kui ka võrdlusaine puhul eelkatstes/sõelkatstes kulunud aega;
- inertse ainega tehtud katsete tulemusi, kui neid tehti;
- inertses atmosfääris tehtud katsete tulemusi, kui neid tehti.

▼B

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Aine loetakse oksüdeerivaks, kui

- a) eelkatses ilmneb tugev reaktsioon;
- b) uuritavate segude suurim täiemahulises katseprogrammis leitud põlemiskiirus on suurem tselluloosist ja baariumnitraadist valmistatud võrdlussegu suurimast põlemiskiirusest või sellega võrdne.

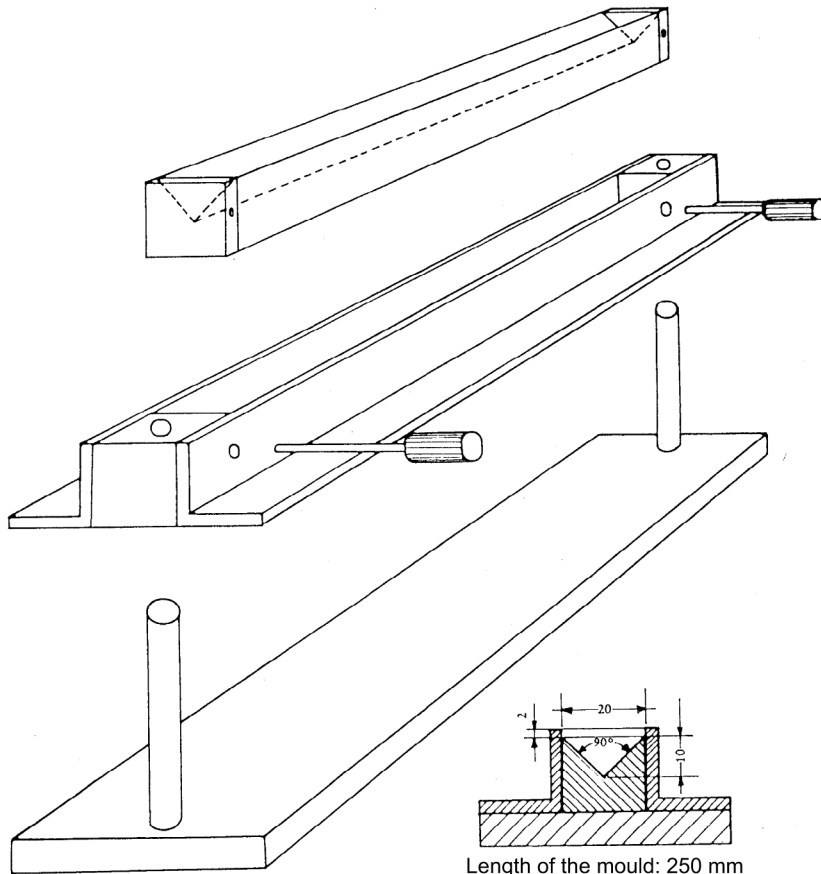
Ekstlike positiivsete tulemuste vältimiseks tuleks tulemuste tõlgendamisel arvesse võtta ka aine inertse materjaliga segamisel ja/või inertses atmosfääris tehtud katsete tulemusi.

4. VIITED

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

▼B*Liide**Joonis***Vorm ja abivahendid põlemisriba valmistamiseks**

(Kõik mõõdud on millimeetrites)

Length of the mould: 250 mm
Material: aluminium

▼B**A.18. POLÜMEERIDE ARVKESKMINE MOLEKULMASS JA MOLEKULMASSIDE JAOTUS****1. MEETOD**

Käesolev geelkromatograafia (GPC) meetod on OECD katsejuhendi nr 118 (1996) koopia. Meetodi põhimõte ja tehniline lisateave on toodud kirjandusviites 1.

1.1. SISSEJUHATUS

Kuna polümeeride omadused on väga erinevad, siis on võimatu kirjeldada ühtainust meetodit, mis kirjeldaks täpselt eraldamis- ja analüüsitingimusi, mis kataks kõiki polümeeride eraldamisel esinevaid võimalikke juhtumeid ja olukordi. Eelkõige on keeruliste polümeerisegude lahutamine geelkromatograafia abil sageli võimatu. Kui geelkromatograafia ei ole kasutatav, siis võib molekulmassi määramiseks kasutada teisi meetodeid (vt lisa). Sellistel juhtudel tuleb kasutatava meetodi kohta esitada kõik üksikasjad ja põhjendused.

Kirjeldatav meetod põhineb standardil DIN 55672 (1). Üksikasjalik teave katsete tegemiseks ja andmete hindamiseks on toodud nimetatud DIN standardis. Kui katse tingimuste muutmine osutub vajalikuks, siis peab vastavaid muudatusi põhjendama. Muude standardite kasutamisel peab nende jaoks andma täielikud viited. Kirjeldatava meetodi kalibreerimiseks kasutatakse teadaoleva polüdispersusega polüstireeni proove ja teatud polümeeride (näiteks vesilahustuvad ja pika ahelaga hargnenud polümeerid) analüüsimiseks võib osutada vajalikuks meetodis muudatuste tegemine.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Arvkeskmise molekulmassi M_n ja masskeskmise molekulmassi M_w arvutamiseks kasutatakse järgmisi valemeid:

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

kus

H_i on detektori signaali kõrgus mõõdetuna baasjoonelt retentsiooniruumala V_i jaoks,

M_i on retentsiooniruumalale V_i vastava polümeerifraktsiooni molekulmass ja

n on mõõtepunktide arv.

Molekulmassi jaotuse ulatus, mis iseloomustab segu disperssust, leitakse M_w/M_n suhtest.

▼ B

1.3. VÖRDLUSAINED

Kuna geelkromatograafia on suhteline meetod, siis peab seda kalibreerima. Selleks otstarbeks kasutatakse tavaliselt kitsa fraktsioonilise jaotusega lineaarseid polüstüreenistandardeid, mille keskmised molekulmassid M_n ja M_w ning molekulmasside jaotus on teada. Kalibreerimiskõverat võib kasutada tundmatu proovi molekulmassi määramiseks vaid siis, kui proovi ja standardi lahutamiseks kasutatavad tingimused on valitud ühesuguselt.

Molekulmassi ja elueerunud ruumala vaheline suhe on õige vaid konkreetsele katsele iseloomulikel tingimustel. Nimetatud tingimused hõlmavad eelkõige temperatuuri, lahustit (või lahustite segu), kromatograafilisi tingimusi ja kasutatavat kolonni või kolonnisüsteemi.

Sellisel viisil proovist määratud molekulmassid on suhtelised ja neid nimetatakse „polüstüreeniekvivalendi molekulmassideks”. See tähendab, et sõltuvalt proovi ja standardi vahelistest struktuurilistest ja keemilistest erinevustest võivad molekulmassid hälbida absoluutsetest väärtustest rohkemal või vähemal määral. Juhul kui kasutatakse teisi standardeid, näiteks polüetüleenlühikool, polüetüleenoksiid, polümetüül metakrülaad, polüakrüülhape, siis peab seda põhjendama.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Geelkromatograafia abil võib määrata nii proovi molekulmassi jaotust kui ka keskmisi molekulmasse (M_n , M_w). Geelkromatograafia on spetsiaalne vedelikkromatograafia liik, milles proov lahutatakse üksikute koostisosade hüdrodünaamiliste ruumalade järgi (2).

Lahutamiseks juhitakse proov läbi poorse materjaliga, tavaliselt orgaanilise geeliga, täidetud kolonni. Väikesed molekulid suudavad tungida pooridesse, kuhu suurte molekulide juurdepääs on takistatud. Seetõttu on suurte molekulide teepikkus lühem ja nad elueeruvad kiiremini. Keskmise suurusega molekulid tungivad osadesse pooridesse, mistõttu nad elueeruvad mõnevõrra aeglasemalt. Kõige väiksemad molekulid, mille keskmine hüdrodünaamiline raadius on väiksem kui geeli poorid, tungivad kõikidesse pooridesse ja elueeruvad viimastena.

Ideaaljuhul mõjutab lahutamist ainult molekulide suurus, kuid praktikas on raske vältida vähemalt mõningaid adsorptsioonist tingitud segavaid mõjusid. Kolonni ebahühtlane täitematerjal ja suurem omaruumala võivad olukorda halvendada (2).

Detekteerimiseks kasutatakse näiteks refraktsiooni indeksit või UV-absorptsiooni ja tulemuseks saadakse lihtne jaotuskõver. Selleks, et omistada saadud kõverale tegelike molekulmassi väärtusi, tuleb kolonni kalibreerida teadaolevate molekulmassidega ja ideaaljuhul üldjoontes sarnase struktuuriga polümeeridega, näiteks erinevad polüstüreenistandardid. Tüüpiliselt saadakse Gaussi kõver, mis on mõnikord madalate molekulmasside osas väljaveninud sabaga, kusjuures vertikaalsel teljel on elueerunud erinevate molekulmassiga ühendite kogus massi järgi ja horisontaalsel teljel on logaritmilises skaalas molekulmass.

▼B

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Elutsiooniruumala korratavus (suhteline standardhälve, RSD) peaks olema parem kui 0,3 %. Kui kromatogrammi hinnatakse ajalise sõltuvuse põhjal ja see ei vasta ülaltoodud kriteeriumitele, tagatakse nõutav analüüsikorratavus sisestandardi kasutamisega (1). Polüdisperssused sõltuvad standardite molekulmassidest. Polüstüreenistandardite kasutamisel on tüüpilised väärtused järgmised:

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

(M_p on piigi maksimumile vastav standardi molekulmass)

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Polüstüreeni standardlahuste valmistamine**

Polüstüreenistandardid lahustatakse ettevaatlikul segamisel valitud eluendiga. Lahuste valmistamisel peab arvestama tootja soovitusi.

Valitud standardi kontsentratsioonid sõltuvad mitmetest erinevatest teguritest, näiteks süsteruumala, lahuse viskoossus ja analüütilise detektori tundlikkus. Maksimaalset süsteruumala peab kohandama vastavalt kolonni pikkusele, et vältida kolonni ülelaadimist. Geelkromatograafia analüütiliste meetodite korral jäävad tüüpilised süsteruumalad vahemikku 40 kuni 100 µl, kui kolonni mõõdud on 30 cm × 7,8 mm. Võimalik on kasutada ka suuremaid ruumalasisid, kuid need ei tohiks ületada 250 µl. Enne kolonni tegelikku kalibreerimist tuleb kindlaks teha süsteruumala ja kontsentratsiooni vaheline optimaalne suhe.

1.6.2. **Proovilahuse valmistamine**

Põhimõtteliselt kehtivad ülaltoodud nõuded ka proovilahuste valmistamisel. Proov lahustatakse sobivas lahustis, näiteks tetrahüdrofuraanis (THF), ettevaatlikul loksutamisel. Mitte mingil juhul ei tohi lahustamiseks kasutada ultrahelivanni. Vajaduse korral puhastatakse proovi lahust membraanfiltriga, mille pooride suurus on 0,2 kuni 2 µm.

Lahustumatute osakeste olemasolu peab ära märkima ka lõplikus aruandes, kuna see võib olla tingitud kõrge molekulmassiga ühenditest. Lahustunud osakeste massiprotsendi määramiseks peab kasutama sobivat meetodit. Valmistatud lahuseid peab kasutama 24 tunni jooksul.

1.6.3. **Seadmed**

- mahuti lahustile;
- degaseerija (vajaduse korral);
- pump;

▼B

- pulsatsioonisummuti (vajaduse korral);
- injektioonisüsteem;
- kromatograafilised kolonnid;
- detektor;
- kulumõõtja (vajaduse korral);
- andmesalvesti ja -tõõtleja;
- nõu jääkide jaoks.

Enne peab kindlaks tegema, et geelkromatograafia süsteem oleks kasutatavate lahustite suhtes inertne (näiteks tetrahüdrofuraani jaoks kasutada teraskapillaare).

1.6.4. Injektiooni ja lahusti etteandmise süsteem

Proovilahuse etteantud kogus sisestatakse automaatse injektoriga või käsitsi täpselt kindlaks määratud kolonni piirkonda. Käsitsi injektiooni korral võib süstla kolvi liiga kiire tagasitõmbamine või vabastamine põhjustada muutusi mõõdetava molekulmassi jaotuses. Lahusti etteandmise süsteem peaks olema võimalikult pulseerimisvaba, sisaldades ideaaljuhul pulsatsioonisummutit. Voolukiirus on suurusjärgus 1 ml/min.

1.6.5. Kolonn

Sõltuvalt proovist kasutatakse polümeeri analüüsiks kas ühte lihtsat kolonni või mitut järjestikku ühendatud kolonni. Kolonni täitematerjalidena on kaubanduslikult kättesaadavad paljud poorsed kindlate omadustega ained (näiteks poori suurus, eksklusioonipiirid). Lahutamiseks kasutatava geeli või kolonni pikkuse valik sõltub nii proovi omadustest (hüdrodünaamiline ruumala, molekulmasside jaotus) kui ka spetsiifilistest lahutamistingimustest, näiteks lahusti, temperatuur ja voolukiirus (1, 2, 3).

1.6.6. Teoreetilised taldrikud

Lahutamiseks kasutatavat kolonni või kolonnide süsteemi iseloomustatakse teoreetiliste taldrikute arvuga. Tetrahüdrofuraani kasutamisel eluendina hinnatakse seda etüülbenseeni või mõne muu sobiva mittepolaarse lahustunud aine (soluudi) laadimisel teadaoleva pikkusega kolonni. Teoreetiliste taldrikute arv saadakse järgmiste valemite põhjal:

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

kus

N = teoreetiliste taldrikute arv

V_e = piigi maksimumile vastav elutsiooniruumala

▼B

W = piigi laius baasjoonel

$W_{1/2}$ = piigi laius poolel piigi kõrgusel

1.6.7. Lahutamise efektiivsus

Lisaks ribalaiust määravale teoreetiliste taldrikute arvule on tähtis ka lahutamise efektiivsus, mis sõltub sellest, kui järsk on kalibreerimiskõvera tõus. Kolonni lahutamiseefektiivsus saadakse järgmisest valemist:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{kolonni ristlõikepindala}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

kus

V_{e, M_x} = polüstireeni molekulmassiga M_x elutsiooniruumala

$V_{e,(10M_x)}$ = kümme korda suurema molekulmassiga polüstireeni elutsiooniruumala

Süsteemi lahutusvõime defineeritakse tavaliselt järgmiselt:

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

kus

V_{e1}, V_{e2} = kahe polüstireenistandardi elutsiooniruumalad piigi maksimumil

W_1, W_2 = piigi laiused baasjoonel

M_1, M_2 = piigi maksimumile vastavad molekulmassid (peaksid erinevad kümme korda)

Kolonnisüsteemi R-väärtus peaks olema suurem kui 1,7 (4).

1.6.8. Lahustid

Kõik lahustid peavad olema kõrge puhtusastmega (kasutatava tetrahydrofuraani puhtus on 99,5 %). Lahusti mahuti (vajaduse korral paigutatud inertgaasi atmosfääri) peab olema piisavalt suur, et võimaldada kolonni kalibreerimist ja proovide analüüsi. Enne pumpamist kolonni peab lahustit degaseerima.

1.6.9. Temperatuurikontroll

Kriitilise tähtsusega komponentide (injektsioonisilmus, kolonnid, detektor ja torustik) temperatuur peab olema konstantne ja sobima kasutatavale lahustile.

▼B1.6.10. **Detektor**

Detektori eesmärk on kolonnist elueeruva proovi kontsentratsiooni kvantitatiivne mõõtmine. Selleks, et vältida piikide tarbetut laiendamist, peab detektori mõõteraku küveti ruumala olema võimalikult väike. See ei tohiks olla suurem kui 10 µl, välja arvatud valguse hajuvust ja viskoossust mõõtvate detektorite korral. Detekteerimiseks kasutatakse tavaliselt diferentsiaalrefraktomeetria. Tingituna proovi või eluendi spetsiifilistest omadustest võib kasutada ka muid detektioonimeetodeid, näiteks UV/VIS, IR, viskoossusdetektorid jms.

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**2.1. **ANDMED**

Hindamiskriteeriumitele ning andmete kogumisele ja töötlemisele esitatavate üksikasjaliste nõuete osas peaks järgima DIN standardit (1).

Iga proovi jaoks peab tegema kaks teineteisest sõltumatut katset. Neid katseid peab eraldi analüüsima.

Iga mõõtmise tulemused peavad hõlmama M_n , M_w , M_w/M_n ja M_p väärtusi. Üheselt mõistetavalt peab näitama, et mõõdetud väärtused on suhtelised väärtused, mis on ekvivalentsed kasutatud standardi molekulmassidega.

Pärast retentsiooniruumalade või -aegade kindlaksmääramist (mida võib parandada sisestandardite kasutamisega) esitatakse $\log M_p$ väärtused (kus M_p on kalibreerimiseks kasutatava standardi piigi maksimum) ühe eeltoodud suuruse funktsioonina. Molekulmassi dekaadi (kümnekordse vahemiku) kohta on vaja vähemalt kahte kalibreerimiskõvera punkti ja terve kõvera jaoks on vaja vähemalt viit mõõtepunkti, mis peaks hinnanguliselt katma proovi molekulmassi. Kalibreerimiskõvera madala molekulmassiga osa lõpp-punkt määratakse kindlaks n-hekstsüülbenseeni või muu sobiva mittepolaarse soluudi abil. Arvkeskmised ja masskeskmised molekulmassid arvutatakse tavaliselt elektroonilise andmetöötlusega, mis põhineb punktis 1.2 toodud valemitel. Käitsi digitaliseerimise kasutamisel võib eeskujuks võtta standardi ASTM D 3536-91 (3).

Jaotuskõvera peab esitama tabeli või joonise kujul (diferentsiaalset sagedus või protsentide summa $\log M$ funktsioonina). Graafilisel kujutamisel peab üks molekulmassi kümnekordne vahemik olema umbes 4 cm laiune ja piigi maksimum peab olema umbkaudu 8 cm kõrgune. Integraalsete jaotuskõverate korral peab ordinaadi 0 ja 100 % vahemik olema umbes 10 cm laiune.

2.2. **ARUANNE**

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

2.2.1. **Katsetatav aine**

— Olemasolev teave analüüsitava aine kohta (identifitseerimiskood, lisandid, ebapuhtused).

▼B

— Proovi eeltötluse täpne kirjeldus, tähelepanekud, probleemid.

2.2.2. Seadmed

— Eluendi mahuti, inertgaas, eluendi degaseerimine, eluendi koostis, eba puhtused.

— Pump, pulsatsioonisummuti, injektioonisüsteem.

— Lahutuskolonnid (tootja, kõik kolonni näitajad, nagu poori suurus, täitematerjali liik jms, kasutatavate kolonnide arv, pikkus ja järjekord).

— Kolonni (või nende kombinatsiooni) teoreetiliste taldrikute arv, lahutamise efektiivsus (süsteemi lahutusvõime).

— Andmed piikide sümmeetria kohta.

— Kolonni temperatuur, temperatuurikontrolli liik.

— Detektor (mõõtmise põhimõte, tüüp, küveti ruumala).

— Kulumõõtja, kui kasutati (tootja, mõõtmispõhimõte).

— Andmete salvestamise ja töötlemise süsteem (riist- ja tarkvara).

2.2.3. Süsteemi kalibreerimine

— Kalibreerimiskõvera koostamiseks kasutatud meetodi täpne kirjeldus.

— Andmed selle meetodi kvaliteedikriteeriumite kohta (näiteks korrelatsioonikoefitsient, ruutsumma viga jms).

— Andmed kõikide ekstrapoleerimiste, oletuste ja lähenduste kohta, mis tehti eksperimendi ning andmete hindamise ja töötlemise käigus;

— Kõik kalibreerimiskõvera koostamiseks tehtud mõõtmised peavad olema dokumenteeritud tabelis, mis sisaldab kalibreerimiskõvera iga punkti kohta alljärgnevat teavet:

— proovi nimetus;

— proovi tootja;

— tootjapoolsed või mõõtmistel saadud standardit iseloomustavad M_p , M_n , M_w ja M_w/M_n väärtused koos määramismetodi üksikasjadega;

— süsteruumala ja -konsentratsioon;

▼B

- kalibreerimisel kasutatud M_p väärtus;
- piigi maksimumile vastav mõõdetud elutsiooniruumala või parandatud retentsiooniaeg;
- piigi maksimumile arvatud M_p ;
- arvatud M_p protsentuaalne viga ja kalibreerimistulemus.

2.2.4. Hindamine

- 1) Aja põhjal hindamine: nõutava korratavuse tagamiseks kasutatavad meetodid (parandusmeetod, sisestandard jms).
 - 2) Teave selle kohta, kas hindamine viidi läbi elutsiooniruumala või retentsiooniaja põhjal.
 - 3) Teave hindamise piiratud kohta, kui piik ei ole täielikult analüüsitud.
 - 4) Silumismeetodite kirjeldus, kui neid kasutati.
 - 5) Proovi ettevalmistamise ja eeltötluse protseduurid.
 - 6) Lahustumatute osakeste olemasolu.
 - 7) Süsteruumala (μ l) ja -kontsentratsioon (mg/ml).
 - 8) Tähelepanekud seikade kohta, mis võivad põhjustada kõrvalekaldumist ideaalsest geelkromatograafia profiilist.
 - 9) Kõikide katseprotseduurides tehtud muudatuste üksikasjalik kirjeldus.
- Veapiiride üksikasjalikud andmed.
 - Mis tahes muu teave ja tähelepanekud, mis puudutavad tulemuste tõlgendamist.

3. VIITED

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*Liide***Näited muudest meetoditest, mida kasutatakse polümeeride arvkeskmise molekulmassi (M_n) määramisel**

Geelkromatograafia (GPC) on eelistatud meetod M_n määramiseks, eriti juhul, kui kättesaadav on standardite kogum, mille struktuur on võrreldav uuritava polümeeri struktuuriga. Kui geelkromatograafia kasutamisel on praktilist laadi raskused või olemasolevate andmete põhjal võib eeldada, et uuritav aine ei vasta esitatavatele M_n kriteeriumitele (vajab eelnevalt kinnitamist), siis on võimalik kasutada alternatiivseid meetodeid, näiteks järgmisi.

1. Kolligatiivsete omaduste kasutamine**1.1. Ebullioskoopia/krüoskoopia**

Hõlmab lahusti keemistemperatuuri tõusu (ebullioskoopia) või külmumistemperatuuri alanemise (krüoskoopia) mõõtmist pärast polümeeri lisamist. Meetod põhineb sellel, et lahustunud polümeeri mõju keemis- või külmumistemperatuurile sõltub polümeeri molekulmassist (1, 2).

Rakendatavus: $M_n < 20\,000$.

1.2. Aururõhu alandamine

Hõlmab valitud võrdlusvedeliku aururõhu mõõtmist enne ja pärast teadaoleva koguse polümeeri lisamist (1, 2).

Rakendatavus: $M_n < 20\,000$ (teoreetiliselt; praktikas siiski piiratud).

1.3. Membraanosmomeetria

Põhineb osmoosi põhimõttel, st tasakaalu saavutamiseks läbivad lahusti molekulid poolläbilaskvat membraani lahjemast lahusest kontsenteeritumasse lahusesse. Katses kasutatav lahja lahus on nullkontsentratsiooniga ja kontsenteeritud lahus sisaldab polümeeri. Läbi membraani tungiv lahusti tekitab rõhkude erinevuse, mis sõltub polümeeri kontsentratsioonist ja molekulmassist (1, 3, 4).

Rakendatavus: M_n vahemikus 20 000 – 200 000.

1.4. Aurufaasi osmomeetria

Hõlmab puhta lahusti aerosooli aurustumiskiiruse võrdlemist vähemalt kolme aerosooliga, mis sisaldavad uuritava polümeeri erinevaid kontsentratsioone (1, 2, 4).

Rakendatavus: $M_n < 20\,000$.

▼B**2. Lõpprühma alüüs**

Selle meetodi kasutamiseks on vajalik teada nii polümeeri üldist struktuuri kui ka ahela otsmiste rühmade keemilist koostist (mis peab olema eristatav põhiahelast näiteks NMR või tütrimise/-derivatiseerimise abil). Polümeeris esinevate otsmiste rühmade molekulaarse kontsentratsiooni määramise kaudu saab leida molekulmassi (7, 8, 9).

Rakendatavus: M_n kuni 50 000 (kahaneva usaldusväärsusega).

3. Viited

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, pp. 25 to 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. MADALAMOLEKULAARSETE AINETE SISALDUS
POLÜMEERIS****1. MEETOD**

Käesolev geelkromatograafia (GPC) meetod on OECD katsejuhendi nr 119 (1996) koopia. Meetodi põhimõtte ja tehniline lisateave on toodud kirjandusviidetes.

1.1. SISSEJUHATUS

Kuna polümeeride omadused on väga erinevad, siis on võimatu kirjeldada ühtainust meetodit, mille lahutamise- ja analüüsitingimused katavad kõiki polümeeride eraldamisel esinevaid võimalikke juhtumeid ja iseärasusi. Sageli ei ole keeruliste polümeerisegude koostisosadeks lahutamine geelkromatograafiaga võimalik. Kui geelkromatograafia ei ole kasutatav, siis võib molekulmassi määramiseks kasutada teisi meetodeid (vt lisa). Sellistel juhtudel tuleb kasutatava meetodi kohta esitada kõik üksikasjad ja põhjendused.

Kirjeldatav meetod põhineb standardil DIN 55672 (1). Üksikasjalik teave katsete tegemiseks ja andmete hindamiseks on toodud nimetatud DIN standardis. Kui katse tingimuste muutmine osutub vajalikuks, siis peab vastavaid muudatusi põhjendama. Kasutada võib ka muid standardeid, kui neile antakse täielikud viited. Kirjeldatava meetodi kalibreerimiseks kasutatakse teadaoleva polüdisperssusega polüstüreenproove ja teatud polümeeride (näiteks vesilahustuvad ja pika ahelaga hargnenud polümeerid) analüüsil võib osutada vajalikuks meetodi muutmine.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Madal molekulmass on kokkuleppeliselt molekulmass, mis on väiksem kui 1 000 daltonit.

Arvkeskmise molekulmassi M_n ja masskeskmise molekulmassi M_w arvutamiseks kasutatakse järgmisi valemeid:

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

kus

H_i = on detektori signaali kõrgus mõõdetuna baasjoonelt retentsioonimahule V_i jaoks

M_i = on retentsioonimahule V_i vastava polümeerifraktsiooni molekulmass ja n on mõõtepunktide arv

Molekulmassi jaotuse laius, mis iseloomustab segu disperssust, saadakse M_w/M_n suhtest.

▼B

1.3. VÖRDLUSAINED

Kuna geelkromatograafia on suhteline meetod, siis peab seda kalibreerima. Selleks otstarbeks kasutatakse tavaliselt kitsa fraktsioonilise jaotusega lineaarseid polüstüreenstandardeid, mille keskmised molekulmassid M_n ja M_w ja molekulmasside jaotus on teada. Kalibreerimiskõverat võib kasutada tundmatu proovi molekulmassi määramiseks vaid siis, kui proovi ja standardi lahutamiseks kasutatavad tingimused on valitud ühtviisi.

Molekulmassi ja elueerunud ruumala vaheline suhe on õige vaid konkreetsele katsele iseloomulikel tingimustel. Nimetatud tingimused hõlmavad eelkõige temperatuuri, lahustit (või lahustite segu), kromatograafilisi tingimusi ja kasutatavat kolonni või kolonnisüsteemi.

Sellisel viisil proovist määratud molekulmassid on suhtelised ja neid nimetatakse „polüstüreeniekvivalendi molekulmassideks”. See tähendab, et sõltuvalt proovi ja standardi vahelistest struktuurilistest ja keemilistest erinevustest võivad molekulmassid hälbida absoluutsetest väärtustest rohkemal või vähemal määral. Juhul kui kasutatakse teisi standardeid, näiteks polüetüleenglükool, polüetüleenoksiid, polümetüülmetakrülaati, polüakrüülhape, siis peab seda põhjendama.

1.4. KATSE MEETODI PÕHIMÕTE

Geelkromatograafiaga võib määrata nii proovi molekulmassi jaotust kui ka keskmisi molekulmasse (M_n , M_w). Geelkromatograafia on spetsiaalne vedelikchromatograafia liik, milles proov lahutatakse üksikute koostisosade hüdrodünaamiliste ruumalade järgi (2).

Lahutamiseks juhitakse proov läbi poorse materjaliga, tavaliselt orgaanilise geeliga, täidetud kolonni. Väikesed molekulid suudavad tungida pooridesse, kuhu suurte molekulide juurdepääs on takistatud. Seetõttu on suurte molekulide teepikkus lühem ja nad elueeruvad kiiremini. Keskmise suurusega molekulid tungivad osadesse pooridesse, mistõttu nad elueeruvad mõnevõrra aeglasemalt. Kõige väiksemad molekulid, mille keskmine hüdrodünaamiline raadius on väiksem kui geeli poorid, tungivad kõikidesse pooridesse ja elueeruvad viimastena.

Ideaaljuhul mõjutab lahutamist ainult molekulide suurus, kuid praktikas on raske vältida vähemalt mõningaid adsorptsioonist tingitud segavaid mõjusid. Kolonni ebahühtlane täitematerjal ja suurem omaruumala võivad olukorda halvendada (2).

Detekteerimiseks kasutatakse näiteks refraktsiooni indeksit või UV-absorptsiooni ja tulemuseks saadakse lihtne jaotuskõver. Selleks, et omistada saadud kõverale tegelikke molekulmassi väärtusi, tuleb kolonni kalibreerida teadaolevate molekulmassidega ja ideaaljuhul üldjoontes sarnase struktuuriga polümeeridega, näiteks erinevad polüstüreenstandardid. Tüüpiliselt saadakse Gaussi kõver, mis on mõnikord madalate molekulmasside osas väljaveninud sabaga, kusjuures vertikaalsel teljel on elueerunud erinevate molekulmassiga ühendite kogus massi järgi ja horisontaalsel teljel on logaritmilises skaalas molekulmass.

▼B

Nimetatud kõveralt saadakse madalmolekulaarsete ainete sisaldus. Arvutused saavad olla täpsed vaid siis, kui madala molekulmassiga ühendid annavad massi alusel detektorile samase signaali kui kogu polümeer.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Elutsiooniruumala korratavus (suhteline standardhälve, RSD) peaks olema parem kui 0,3 %. Kui kromatogrammi hinnatakse ajalise sõltuvuse põhjal ja see ei vasta ülaltoodud kriteeriumitele, tagatakse analüüsi nõutav korratavus sisestandardi kasutamisega (1). Polüstüreeni standardite molekulmassidest. Polüstüreenistandardite kasutamisel on tüüpilised väärtused järgmised:

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

(M_p on piigi maksimumile vastav standardi molekulmass)

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. Polüstüreeni standardlahuste valmistamine

Polüstüreeni standardid lahustatakse ettevaatlikul segamisel valitud eluendiga. Lahuste valmistamisel peab arvestama tootja soovitusi.

Valitud standardi kontsentratsioonid sõltuvad mitmetest erinevatest teguritest, näiteks süsteruumala, lahuse viskoossus ja analüütilise detektori tundlikkus. Maksimaalset süsteruumala peab kohandama vastavalt kolonni pikkusele, et vältida kolonni ülelaadimist. Geelkromatograafia analüütiliste meetodite korral jäävad tüüpilised süsteruumalad vahemikku 40 kuni 100 μl , kui kolonni mõõdud on 30 cm \times 7,8 mm. Võimalik on kasutada ka suuremaid ruumalasisid, kuid need ei tohiks ületada 250 μl . Enne kolonni tegelikku kalibreerimist tuleb kindlaks teha süsteruumala ja kontsentratsiooni vaheline optimaalne suhe.

1.6.2. Proovilahuse valmistamine

Põhimõtteliselt kehtivad ülaltoodud nõuded ka proovilahuste valmistamisel. Proov lahustatakse sobivas lahustis, näiteks tetrahydrofuraanis (THF), ettevaatlikul loksutamisel. Mitte mingil juhul ei tohi lahustamiseks kasutada ultrahelivanni. Vajaduse korral puhastatakse proovi lahust membraanfiltriga, mille pooride suurus on 0,2 kuni 2 μm .

Lahustumatute osakeste olemasolu peab ära märkima ka lõplikus aruandes, kuna see võib olla tingitud kõrge molekulmassiga ühenditest. Lahustunud osakeste massiprotsendi määramiseks peab kasutama sobivat meetodit. Valmistatud lahuseid peab kasutama 24 tunni jooksul.

▼B**1.6.3. Parandused ebapuhtuste ja lisandite sisalduse jaoks**

Tavaliselt on vajalik molekulmassiga $M < 1\,000$ ühendite sisalduse korrigeerimine, mis on tingitud mittepõlümeeersetest komponentidest (näiteks ebapuhtused ja/või lisandid), välja arvatud juhul, kui nende ühendite mõõdetud sisaldus on niigi $< 1\%$. Selleks analüüsitakse otse polümeerilahust või geelkromatograafi eluaati.

Kui eluaat on pärast kolonni läbimist liiga lahja edasiseks analüüsiks, siis peab seda kontsentreerima. Vajalik võib olla eluaadi kuivaks aurutamine ja saadud jäägi uuesti lahustamine. Eluaati peab kontsentreerima tingimustel, mis ei põhjusta eluaadis muutusi. Geelkromatograafi eluaadi töötlemine sõltub kvantitatiivseks määramiseks kasutatavast analüütilisest meetodist.

1.6.4. Seadmed

Geelkromatograafia seadmed sisaldavad järgmisi komponente:

- mahuti lahustile;
- degaseerija (vajaduse korral);
- pump;
- pulsatsioonisummuti (vajaduse korral);
- injektioonisüsteem;
- kromatograafilised kolonnid;
- detektor;
- kulumõõtja (vajaduse korral);
- andmesalvesti ja-töötleja;
- nõu jääkide jaoks.

Enne peab kindlaks tegema, et geelkromatograafia süsteem oleks kasutatavate lahustite suhtes inertne (näiteks tetrahüdrofuraani jaoks kasutada teraskapillaare).

1.6.5. Injektiooni ja lahusti etteandmise süsteem

Proovilahuse etteantud kogus sisestatakse automaatse injektoriga või käsitsi täpselt kindlaks määratud kolonni piirkonda. Käsitsi injektiooni korral võib süstla kolvi liiga kiire tagasitõmbamine või vabastamine põhjustada muutusi mõõdetava molekulmassi jaotuses. Lahusti etteandmise süsteem peaks olema võimalikult pulseerimisvaba, sisaldades ideaaljuhul pulsatsioonisummutit. Voolukiirus on suurusjärgus 1 ml/min.

1.6.6. Kolonn

Sõltuvalt proovist kasutatakse polümeeri iseloomustamiseks kas ühte kolonni või mitut järjestikku ühendatud kolonni. Kolonni täitematerjalidena on kaubanduslikult kättesaadavad paljud poorsed kindlate omadustega ained (näiteks poori suurus, eksklusioonipiirid). Lahutamiseks kasutatava geeli või kolonni pikkuse valik sõltub nii proovi omadustest (hüdrodünaamiline ruumala, molekulmasside jaotus) kui ka spetsiifilistest lahutamistingimustest, näiteks lahusti, temperatuur ja voolukiirus (1, 2, 3).

▼B1.6.7. **Teoreetilised taldrikud**

Lahutamiseks kasutatavat kolonni või kolonnide süsteemi iseloomustatakse teoreetiliste taldrikute arvuga. Tetrahüdrofuraani kasutamisel eluendina hinnatakse seda etüülbenseeni või mõne muu sobiva mittepolaarse lahustunud aine (soluudi) laadimisel teadaoleva pikkusega kolonni. Teoreetiliste taldrikute arv saadakse järgmistest valemite põhjal:

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

kus

N = on teoreetiliste taldrikute arv

V_e = on piigi maksimumile vastav elutsiooniruumala

W = on piigi laius baasjoonel

$W_{1/2}$ = on piigi laius poolel piigi kõrgusel

1.6.8. **Lahutamise efektiivsus**

Lisaks ribalaiust määravale teoreetiliste taldrikute arvule on tähtis ka lahutamise efektiivsus, mis sõltub sellest, kui järsk on kalibreerimiskõvera tõus. Kolonni lahutuse efektiivsus saadakse järgmisest seosest:

$$\frac{V_{e,M_x} - V_{e,(10M_x)}}{\text{kolonni ristlõikepindala}} \geq 6,0 \left[\frac{\text{cm}^3}{\text{cm}^2} \right]$$

kus

V_e, M_x = on polüstireeni molekulmassiga M_x elutsiooniruumala

$V_{e,(10M_x)}$ = on kümme korda suurema molekulmassiga polüstireeni elutsiooniruumala

Süsteemi lahutusvõimet defineeritakse tavaliselt järgmiselt:

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

kus

V_{e1}, V_{e2} = on kahe polüstireenistandardi elutsiooniruumalad piigi maksimumil

W_1, W_2 = on piigi laiused baasjoonel

M_1, M_2 = on piigi maksimumile vastavad molekulmassid (peaksid erineva kümme korda)

Kolonnisüsteemi R-väärtus peaks olema suurem kui 1,7 (4).

▼B**1.6.9. Lahustid**

Kõik lahustid peavad olema kõrge puhtusastmega (kasutatava tetra-hüdrofuraani puhtus on 99,5 %). Lahustimahuti (vajaduse korral paigutatud inertgaasi atmosfääri) peab olema piisavalt suur, et võimaldada kolonni kalibreerimist ja proovide analüüsi. Enne pumpamist kolonni peab lahustit degaseerima.

1.6.10. Temperatuurikontroll

Kriitilise tähtsusega komponentide (injektsioonisilmus, kolonnid, detektor ja torustik) temperatuur peab olema konstantne ja sobima kasutatavale lahustile.

1.6.11. Detektor

Detektori eesmärk on kolonnist elueeruva proovi kontsentratsiooni kvantitatiivne mõõtmine. Selleks, et vältida piikide tarbetut laiendamist, peab detektori mõõteraku küveti ruumala olema võimalikult väike. See ei tohiks olla suurem kui 10 µl, välja arvatud valguse hajuvust ja viskoossust mõõtvate detektorite korral. Detektorina kasutatakse tavaliselt diferentsiaalrefraktomeetria. Tingituna proovi või eluendi spetsiifilistest omadustest võib kasutada ka muud tüüpi detektsioonimeetodeid, näiteks UV/VIS, IR, viskoossusdetektorid jms.

2. ANDMED JA ARUANDLUS**2.1. ANDMED**

Hindamiskriteeriumitele ning andmete kogumisele ja töötlemisele esitatavate üksikasjalike nõuete osas peaks järgima DIN standardit (1).

Iga proovi jaoks peab tegema kaks teineteisest sõltumatut katset. Neid katseid peab eraldi analüüsima. Kõikidel juhtudel on oluline arvestada ka pimekatse andmeid, mis on tehtud prooviga samadel katsetingimustel.

Üheselt mõistetavalt peab näitama, et mõõdetud väärtused on suhtelised väärtused, mis on ekvivalentsed kasutatud standardi molekulmassidega.

Pärast retentsiooniruumalade või -aegade kindlaksmääramist (mida võib parandada sisestandardite kasutamise) esitatakse log M_p väärtused (kus M_p on kalibratsioonistandardi piigi maksimum) ühe järgnevalt toodud suuruse funktsioonina: M_n , M_w või M_w/M_n . Molekulmassi dekaadi (kümnekordse vahemiku) kohta on vaja vähemalt kahte kalibreerimiskõvera punkti ja terve kõvera jaoks on vaja vähemalt viit mõõtepunkti, mis peaks hinnanguliselt katma proovi molekulmassi. Kalibreerimiskõvera madala molekulmassiga osa lõpppunkt määratakse kindlaks n-heksüülbenseeni või muu sobiva mittepolarse soluudi abil. Kõvera osa, mis vastab molekulmassidele alla 1 000, analüüsitakse ja parandatakse ebapuhtuste ja lisandite suhtes. Elutsioonikõveraid analüüsitakse tavaliselt elektrooniliste andmetöötamise vahenditega. Käsitsi digitaliseerimise kasutamisel võib eeskujuks võtta standardi ASTM D 3536-91 (3).

▼B

Juhul, kui mis tahes lahustumatu polümeer jääb kolonni, siis on selle molekulmass tõenäoliselt suurem kui mis tahes komponendi oma lahustuvas fraktsioonis ja selle arvesse võtmata jätmisel hinnatakse üle madala molekulmassiga komponentide sisaldust. Madala molekulmassiga komponentide sisalduse määramise parandusjuhised lahustumatu polümeeri jaoks on toodud lisas.

Jaotuskõvera peab esitama tabeli või joonise kujul (diferentsiaalne sagedus või protsentide summa $\log M$ funktsioonina). Graafilisel kujutamisel peab üks molekulmassi kümnekordne vahemik olema umbes 4 cm laiune ja piigi maksimum peab olema umbkaudu 8 cm kõrgune. Integraalsete jaotuskõverate korral peab ordinaadi 0 ja 100 % vahemik olema umbes 10 cm laiune.

2.2. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

2.2.1. Katsetatav aine

— Olemasolev teave analüüsitava aine kohta (identifitseerimiskood, lisandid, ebapuhtused).

— Proovi eeltötluse täpne kirjeldus, tähelepanekud, probleemid.

2.2.2. Seadmed

— Eluendimahuti, inertgaas, eluendi degaseerimine, eluendi koostis, ebapuhtused.

— Pump, pulsatsioonisummuti, injektsioonisüsteem.

— Lahutuskolonnid (tootja, kõik kolonni näitajad, nagu poori suurus, täitematerjali liik jms, kasutatavate kolonnide arv, pikkus ja järjekord).

— Kolonni (või nende kombinatsiooni) teoreetiliste taldrikute arv, lahutamise efektiivsus (süsteemi lahutusvõime).

— Andmed piikide sümmeetria kohta.

— Kolonni temperatuur, temperatuurikontrolli liik.

— Detektor (mõõtmispõhimõte, tüüp, küveti ruumala).

— Kulumõõtja, kui kasutati (tootja, mõõtmispõhimõte).

— Andmete salvestamise ja töötlemise süsteem (riist- ja tarkvara).

2.2.3. Süsteemi kalibreerimine

— Kalibreerimiskõvera koostamiseks kasutatud meetodi täpne kirjeldus.

▼ B

- Andmed selle meetodi kvaliteedinõuete kohta (näiteks korrelatsioonikoefitsient, ruutsumma viga jms).
- Andmed kõikide ekstrapoleerimiste, oletuste ja lähenduste kohta, mis tehti eksperimendi ning andmete hindamise ja töötlemise käigus.
- Kõik kalibreerimiskõvera koostamiseks tehtud mõõtmised peavad olema dokumenteeritud tabelis, mis sisaldab kalibreerimiskõvera iga punkti kohta alljärgnevat teavet:
 - proovi nimetus;
 - proovi tootja;
 - tootjapoolsed või mõõtmistel saadud standardit iseloomustavad M_p , M_n , M_w ja M_w/M_n väärtused, koos määramismetodi üksikasjadega;
 - süsteruumala ja -kontsentratsioon;
 - kalibreerimisel kasutatud M_p väärtus;
 - piigi maksimumile vastav mõõdetud elutsiooniruumala või parandatud retentsiooniaeg;
 - piigi maksimumile arvatud M_p ;
 - arvatud M_p protsentuaalne viga ja kalibreerimistulemus.

2.2.4. Andmed madalamolekulaarse polümeeri sisalduse kohta

- Analüüsimetodite kirjeldus ja katsete tegemise viis.
- Madalamolekulaarsete komponentide protsentuaalne sisaldus (massi järgi) võrreldes kogu prooviga.
- Andmed ebapuhtuste, lisandite ja muude mittepõlmeersete komponentide kohta massiprotsendina kogu proovist.

2.2.5. Hindamine

- Retentsiooniaja järgi hindamine: nõutava korratavuse tagamiseks kasutatavad meetodid (parandusmeetod, sisestandard jms).
- Teave selle kohta, kas hinnati elutsiooniruumala või retentsiooniaja põhjal.
- Teave hindamise piiratuse kohta, kui piik ei ole täielikult analüüsitud.
- Silumismeetodite kirjeldus, kui neid kasutati.
- Proovi ettevalmistamise ja eeltötluse protseduurid.
- Lahustumatute osakeste olemasolu.

▼B

- Süsteruumala (μ l) ja -kontsentratsioon (mg/ml).
- Tähelepanekud seikade kohta, mis võivad põhjustada kõrvalekalandumist ideaalsest geelkromatograafia profiilist.
- Kõikide katseprotseduurides tehtud muudatuste üksikasjalik kirjeldus.
- Veapiiride üksikasjalikud andmed.
- Mis tahes muu teave ja tähelepanekud, mis puudutavad tulemuste tõlgendamist.

3. **VIITED**

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*Liide***Madala molekulmassiga komponentide sisalduse parandamise juhised lahustumatu polümeeri olemasolul**

Proovis sisalduv lahustumatu polümeer põhjustab massikadu geelkromatograafilises analüüsis. Lahustumatu polümeer jääb pöördumatult kolonni või proovi ettevalmistamisel kasutatud filtrile, kuid proovi lahustuv osa läbib kolonni. Kui polümeeri refraktsiooniindeksi juurdekasvu (dn/dc) saab hinnata või mõõta, siis on võimalik hinnata proovi massikadu kolonnis. Sellisel juhul kasutatakse paranduse tegemiseks välist kalibreerimist teadaoleva kontsentratsiooniga ja dn/dc väärtusega standardainetega, et kalibreerida refraktomeetri signaali. Järgnevas näites kasutatakse polü(metüülmetakrülaati) (pMMA) standardit.

Akrüülpolümeeri analüüsil välise kalibreerimise saamiseks viiakse geelkromatograafi teadaoleva kontsentratsiooniga pMMA standardi lahuse tetrahüdrofuraanis ja saadud andmeid kasutatakse refraktomeetri konstandi leidmiseks järgmise valemi põhjal:

$$K = R/(C \times V \times dn/dc)$$

kus

K = refraktomeetri konstant (mikrovoltsekund/ml)

R = pMMA standardi signaal (mikrovolt/sekund)

C = pMMA standardi kontsentratsioon (mg/ml)

V = süsteruumala (ml) ja dn/dc pMMA lahuse tetrahüdrofuraanis refraktsiooniindeksi juurdekasv (ml/mg)

Järgmised andmed on tüüpilised pMMA standardi jaoks:

R = 2 937 891

C = 1,07 mg/ml

V = 0,1 ml

dn/dc = 9×10^{-5} ml/mg

Saadavat K väärtust, $3,05 \times 10$, kasutatakse teoreetilise detektori signaali arvutamiseks, kui 100 % süstitud polümeerist elueerus läbi detektori.

▼B**A.20. POLÜMEERIDE LAHUSTUMIS-/EKSTRAHEERUMISKÄITUMINE VEES****1. MEETOD**

Kirjeldatav meetod on OECD katsejuhendi nr 120 (1997) parandatud versiooni koopia. Täpsem tehniline lisateave on toodud kirjandusviites (1).

1.1. SISSEJUHATUS

Osade polümeeride, nagu emulsioonipolümeerid, korral on vajalik eeltötlus enne allkirjeldatud meetodi kasutamist. Meetod ei ole kasutatav vedelate polümeeride ja katsetingimustel veega reageerivate polümeeride jaoks.

Kui meetod ei ole otstarbekohane või võimalik, siis võib polümeeri lahustumis- või ekstraheerumiskäitumist uurida muude meetodite abil. Sellistel juhtudel tuleb kasutatava meetodi kohta esitada kõik üksikasjad ja põhjendused.

1.2. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Polümeeride lahustumis- või ekstraheerumiskäitumist vesilahuses uuritakse muudatustega kolvimeetodil (vt A.6 „Vees lahustuvus”, „Kolvimeetod”), mida on alljärgnevalt kirjeldatud.

1.4. KVALITEEDINÕUDED

Puuduvad.

1.5. MEETODI KIRJELDUS**1.5.1. Seadmed**

Meetodi jaoks on vajalikud järgmised seadmed:

- purustamiseseade, näiteks jahvatusmasin, kindla suurusega osakeste valmistamiseks;
- seade loksutamiseks, temperatuurikontrolli võimalusega;
- membraanfiltratsiooni süsteem;
- asjakohased analüütilised seadmed;
- standardsed sõelad.

1.5.2. Proovi ettevalmistus

Esindusliku proovi peab esmalt vähendama osakeste suuruseni 0,125 kuni 0,25 mm, kasutades vastavaid sõelu. Proovi stabiilsuse tagamiseks või jahvatamiseks võib vajalik olla jahutamine. Kummilaadseid materjale saab purustada vedela lämmastiku temperatuuril (1).

Kui osakeste soovitud suurusega fraktsioon ei ole saavutatav, peab vähendama osakeste suurust nii palju kui võimalik ja saadud tulemused protokollima. Protokollis peab täpselt ära näitama, mil viisil säilitati purustatud proovi enne katset.

▼B**1.5.3. Protseduur**

Katsetatava aine kolm proovi (igäüks 10 g) kaalutakse vastavalt kolme klaaskorgiga varustatud nõusse ja igäühte lisatakse 1 000 ml vett. Kui polümeeri koguses 10 g ei ole võimalik käsitleda, siis peab kasutama suurimat kogust, mille käsitlemine on veel võimalik, ja muutma vastavalt sellele ka vee kogust.

Nõud suletakse tihedalt ja seejärel loksutatakse temperatuuril 20 °C. Kasutada tuleks konstantsel temperatuuril töötavat loksutit või segajat. 24 tunni pärast tsentrifuugitakse või filtritakse iga nõu sisu ja selges veefaasis määratakse polümeeri kontsentratsioon sobiva analüüsimeetodiga. Kui veefaasi jaoks puudub sobiv analüüsimeetod, siis võib summaarset lahustuvust/ekstraktiivsust hinnata filtril oleva jäägi või tsentrifuugimise sademe kuivkaalu põhjal.

Tavaliselt on vajalik ebapuhtuste ja lisandite ning madala molekulmassiga komponentide kvantitatiivne eristamine. Gravimeetrilise analüüsi korral on tähtis sooritada ka pimekatse ilma testaineta, et hinnata katseprotseduurist tingitud jääkide kogust.

Polümeeride lahustumis- või ekstraheerumiskäitumist vesilahuses temperatuuril 37 °C ning pH 2 ja pH 9 juures võib määrata samal viisil, nagu kirjeldati katse tegemist temperatuuril 20 °C. Vastava pH väärtuse saavutamiseks võib lisada kas sobivaid puhvreid, happeid või aluseid, nagu vesinikkloriidhape, etaanhape, analüütilise puhtusega naatrium- või kaaliumhüdroksiid või ammoniaak.

Sõltuvalt analüüsimeetodist peaks tegema ühe või kaks katset. Kui polümeeri vesilahuse otsese analüüsi jaoks on olemas piisavalt spetsiifilised meetodid, siis piisab ühest eelnevalt kirjeldatud katsest. Kui sellised meetodid ei ole kättesaadavad ja polümeeri lahustumis- või ekstraheerumiskäitumise määramine piirdub vaid kaudse analüüsiga, kus määratakse veefaasi kogu orgaanilise süsiniku sisaldus (TOC), peab tegema lisakatse. Lisakatse hõlmab samuti kolme paralleelkatset, milles kasutatakse kümme korda väiksemat polümeerikogust ja sama veekogust, mida kasutati esimeses katsest.

1.5.4. Analüüs**1.5.4.1. Ühe proovi suurusega tehtud katse**

Polümeeri komponentide otseseks analüüsiks veefaasis võib olla sobivaid meetodeid. Alternatiivina saab kasutada lahustunud või ekstraheerunud polümeeri komponentide kaudset analüüsi, millega määratakse lahustuvate komponentide üldine sisaldus ning tehakse parandusi polümeerile mittespetsiifiliste komponentide osas.

Kõikide polümeeri komponentide analüüs veefaasis on võimalik kas piisavalt tundliku meetodiga, näiteks

kogu orgaanilise süsiniku määramine (TOC), kasutades persulfaadi või dikromaadiga lagundamist, tekkiva süsinikdioksiidi koguse määramiseks kasutatakse infrapunaspetskoopiat või keemilisi analüüsimeetodeid;

— aatomabsorptsioonspektromeetria (AAS) või induktiivsidadestunud plasma (ICP) emissioonspektromeetria, kui polümeer sisaldab ränit või metalle;

▼B

- UV-absorptsioon või spektrofluoromeetria arüülpolümeeride jaoks;
- vedelikkromatograafia – mass-spektromeetria (LC-MS) madala molekulmassiga proovide jaoks,
- või aurutades vee ekstrakti kuivjäägini ja analüüsides saadud jääki spektroskoopiliselt (IR, UV jms) või AAS/ICP abil.

Kui veefaasi analüüs ei ole teostatav, siis peaks vesiekstrakti ekstraheerima vees segunematu orgaanilise lahustiga, näiteks klorosüvetsinikiga. Lahusti aurutatakse ja saadud jäägis analüüsitakse ülalnimetatud polümeeri sisaldust. Selles jäägis sisalduvad ebapuhtusena või lisanditena identifitseeritud komponendid lahutatakse tulemusest, et määrata polümeeri lahustumis- või ekstraheerumisastet.

Kui proov sisaldab suhteliselt palju sellist materjali, siis võib jääki analüüsida vedelikkromatograafia (HPLC) või gaaskromatograafia (GC) abil, et eraldada ebapuhtused monomeeridest ja monomeeridest pärinevatest komponentidest nii, et saab määrata monomeeride tegeliku koguse.

Osadel juhtudel on piisav orgaanilise lahusti aurutamine kuivjäägini ja saadud jäägi kaalumine.

1.5.4.2. *Kahe erineva proovi suurusega tehtud katse*

Kõikides vesiekstraktides analüüsitakse kogu orgaanilist süsinikku (TOC).

Proovi lahustumatut või ekstraheerumatut osa analüüsitakse gravimeetriselt. Kui pärast iga nõu sisu tsentrifugimist või filtrimist on nõu seintel polümeeri jääke, siis peab nõud loputama filtraadiga, kuni selle seintel ei ole jääke näha. Seejärel filtritakse või tsentrifugitakse filtraati uuesti. Filtril või tsentrifugiklaasis olevat jääki kuivatatakse temperatuuril 40 °C vaakumis ning kaalutakse. Kuivatamist jätkatakse kuni konstantse kaalu saavutamiseni.

2. **ANDMED**

2.1. ÜHE PROOVI SUURUSEGA TEHTUD KATSE

Kõigi kolme kolvikatse tulemused ja keskmised väärtused peab esitama ja tulemused tuleb väljendada massiühikutes lahuse ruumala kohta (tüüpiliselt mg/l) või massiühikutes polümeeri proovi massi kohta (tüüpiliselt mg/g). Lisaks tuleb esitada proovi massikadu (arvutatakse soluudi massi jagamisel esialgse proovi massiga). Katsete puhul tuleks arvutada ka suhteline standardhälve (RSD). Kogu proovi (polümeer + olulised lisandid jms) ja ainult polümeeri (pärast selliste lisandite mõju lahutamist) kohta peab esitama eraldi tulemused.

▼B**2.2. KAHE ERINEVA PROOVI SUURUSEGA TEHTUD KATSE**

Kahest kolme paralleelkatsega eksperimendist saadud TOC väärtused ja iga eksperimendi keskmine tuleb esitada massiühikuna lahuse ruumala kohta (tavaliselt mgC/l) ja massiühikuna proovi massi kohta (tavaliselt mgC/g).

Kõrge ja madala proovi/vee suhtega katsetulemuste vahelise erinevuse puudumine viitab sellele, et kõik ekstraheeruvad komponendid on ekstraheerunud. Sellistel juhtudel ei ole tavaliselt otsene analüüs vajalik.

Jääkide massid peab esitama ja tulemused tuleb väljendada protsendina proovi esialgses massist. Iga katse jaoks peab arvutama keskmise. Erinevused 100 % ja leitud protsendi vahel esitavad lahustuva ja ekstraheeruva materjali protsendilist sisaldust esialgses proovis.

3. ARUANDLUS**3.1. ARUANNE**

Katsetulemused peavad sisaldama järgmist teavet.

3.1.1. Katsetatav aine

— Olemasolev teave analüüsitava ühendi kohta (identifitseerimiskood, lisandid, ebapuhtused, madala molekulmassiga komponentide sisaldus).

3.1.2. Katse tingimused

— Kasutatud protseduuride kirjeldus ja katse tingimused.
— Analüütiliste ja määramismeetodite kirjeldus.

3.1.3. Tulemused

— Lahustuvuse/ekstraktiivsuse tulemused (mg/l); erinevates lahustes tehtud ekstraktsioonikatsete üksikud ja keskmised väärtused, lagunenu polümeeri sisaldus, ebapuhtused, lisandid jms.
— Polümeeri lahustuvuse/ekstraktiivsuse tulemused (mg/g).
— Kui mõõdeti, siis vee ekstraktide TOC tulemused, soluudi mass ja arvutatud protsendid.
— Iga proovi pH väärtus.
— Pimekatsete tulemused.
— Kus vajalik, peab viitama katsetatava ühendi keemilisele ebastabiilsusele nii katse kui ka analüütilise protsessi käigus.
— Kogu teave, mis on oluline tulemuste tõlgendamisel.

4. VIITED

1. DIN 53733 (1976) Zerkleinerung von Kunststoffergeugnissen für Prüfzwecke.

▼B**A.21. OKSÜDEERIMISVÕIME (VEDELIKUD)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Käesolev katsemeetod on välja töötatud selleks, et mõõta vedeliku võimet suurendada põleva materjali põlemiskiirust või põlemisintensiivsust või moodustada segu tuleohtliku ainega, mis süttib iseeneslikult juhul, kui need kaks ainet segatakse omavahel põhjalikult. See põhineb oksüdeerivate vedelike (1) ÜRO katsel ja on sellega samaväärne. Kuna käesolev meetod A.21 on algselt ette nähtud vastama määruse (EÜ) nr 1907/2006 nõuetele, on vaja teha võrdlus üksnes ühe võrdlusainega. Katsete tegemine ja võrdlemine täiendava võrdlusainega võib olla vajalik juhul, kui eeldatakse, et katse tulemusi kasutatakse muudel eesmärkidel (1).

Käesolevat katset ei ole vaja teha juhul, kui struktuurivalemi uurimine teeb kahtlusteta kindlaks, et aine ei reageeri tuleohtliku materjaliga eksotermiliselt.

On kasulik teada enne katsetamist, kas aine võib plahvatada.

Käesolev katse ei ole kasutatav tahkete ainete, gaaside, plahvatusohtlike või kergestisüttivate ainete ega orgaaniliste peroksiidide puhul.

Käesolevat katset ei ole vaja teha juhul, kui oksüdeerivaid vedelikke (1) käsitlevas ÜRO katses on tulemused uuritava katseaine kohta juba olemas.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Keskmine rõhutõhusaeg on katse käigus manomeeterrõhu suurenemiseks 690 kPa-lt 2 070 kPa-le kulunud aegade keskmine.

1.3. VÕRDLUSAINE

Võrdlusainena kasutatakse 65 %list (massiprotsent) lämmastikhappe vesilahust (analüütiliselt puhas) (2).

(1) Näiteks ÜRO transpordieeskirjade raames.

(2) Hapet tuleks kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks enne katse tegemist tiitrida.

▼B

Kui katse tegija näeb ette, et katse tulemusi võib lõpuks kasutada muudel eesmärkidel, ⁽¹⁾ võib soovi korral samuti osutada vajalikuks katse tegemine täiendavate võrdlusainetega ⁽²⁾.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritav vedelik segatakse kiudtselluloosiga massisuhtes 1:1 ja pannakse surveanumasse. Kui segamisel või anuma täitmisel ilmneb isesüttimine, ei ole vaja katsete tegemist jätkata.

Kui isesüttimist ei toimu, tehakse kogu katse. Segu kuumutatakse surveanumas ja määratakse kindlaks keskmine aeg, mis kulub manomeeterõhu suurenemiseks 690 kPa-lt 2 070 kPa-le. Seda võrreldakse sellise keskmise ajaga, mis kulub võrdlusaine(te) ja tselluloosi 1:1 segu korral rõhu suurenemiseks.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Ühe ainega tehtud viiest katsest koosnevas seerias ei tohi ükski tulemus erineda aritmeetilisest keskmisest rohkem kui 30 %. Tulemused, mis erinevad keskmisest rohkem kui 30 %, jäetakse kõrvale, täiustatakse segamis- ja täitmismenetlust ning korratakse katset.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

1.6.1. Ettevalmistus

1.6.1.1. Põlev aine

Põleva ainega kasutatakse kuivatatud kiudtselluloosi, mille kiu pikkus on 50–250 µm ja keskmine läbimõõt on 25 µm ⁽³⁾. Seda kuivatatakse konstantse kaaluni kuni 25 mm paksuses kihis 105 °C juures neli tundi ja hoitakse eksikaatoris koos desikandiga kuni jahtumise ja kasutamiseni. Kuivatatud tselluloosi niiskusesisaldus peaks olema alla 0,5 % kuivmassist ⁽⁴⁾. Vajaduse korral peaks selle tagamiseks kuivatamisega pikendama ⁽⁵⁾. Tselluloosi sama partiid kasutatakse kogu uuringu vältel.

⁽¹⁾ Näiteks ÜRO transpordieeskirjade raames.

⁽²⁾ Nt 50 % (massiprotsent) perkloorhapet ja 40 % (massiprotsent) naatriumkloriidi kasutatakse viites 1.

⁽³⁾ Nt Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, katalooginumber 4021 050.

⁽⁴⁾ Kinnitatakse nt tiitrimisega Karl-Fischeri järgi.

⁽⁵⁾ Nimetatud niiskusesisaldust on võimalik saavutada ka nt kuumutamisel 105 °C juures vaakumis 24 tunni jooksul.

▼B1.6.1.2. *Seadmed*1.6.1.2.1. *Surveanum*

Vaja läheb surveanumat. Anumaks on silindriline terasest anum, mille pikkus on 89 mm ja välisläbimõõt on 60 mm (vt joonist 1). Vastaskülgedel paikneb kaks tasapinnalist süvendit (millega on anuma sise- ja välisruumi vähendatud 50 mm-ni) süüteküünla ja väljalaskeava korgi paigaldamise hõlbustamiseks. Anumas oleva 20 mm siseläbimõõduga kanali mõlemas otsas on 19 mm astmetaoline laiend, mis on keermestatud vastavalt Briti standardsele 1" torukeermele (*British Standard Pipe – BSP*) või samaväärsele meeterkeermele. Surveanuma kumerasse külgpinda on ühest otsast 35 mm kaugusele kruvitud külgharu, mis paikneb tasapinnaliste süvenditega 90° nurga all ning mis on ette nähtud ühendamiseks rõhuanduriga. Külgharu pesa moodustab 12 mm sügavune puuritud ava, mis on keermestatud vastavalt külgharu otsas oleva 1/2" BSP keermega (või samaväärse meeterkeermega). Vajaduse korral paigaldatakse inertne tihend, mis tagab hermeetilise ühenduskoha. Külgharu ulatub 55 mm surveanuma korpusest väljapoole ja sellesse on puuritud kanal siseläbimõõduga 6 mm. Külgharu otsas on astmetaoline keermestatud süvend, mis on ette nähtud ühendamiseks membraani tüüpi rõhuanduriga. Kasutada võib mis tahes rõhumõõturit, tingimusel et seda ei mõjuta kuumad gaasid või lagunemissaadused ning et see on võimeline reageerima rõhutõhusudele 690 – 2 070 kPa vähem kui 5 ms jooksul.

Surveanuma külgharust kaugemal asuv ots on suletud süüteküünlaga, milles on kaks elektroodi – üks on isoleeritud küünla korpusest ja teine on sellega ühendatud (maandatud). Surveanuma teine ots on suletud puruneva membraaniga (purunemissurve ligikaudu 2 200 kPa), mida hoiab paigal 20 mm läbimõõduga puuritud avaga kork. Vajaduse korral kasutatakse ühenduskoha hermeetilisuse tagamiseks inertset tihendit. Tugiraam (joonis 2) hoiab komplekti kasutamise ajal õiges asendis. Tugiraam koosneb tavaliselt pehmest rauast alusplaadist, mille mõõtmed on 235 mm × 184 mm × 6 mm, ja 185 mm pikkusest õõnsusega ruudukujulisest sektsioonist (S.H.S.) mõõtmetega 70 mm × 70 mm × 4 mm.

Õõnsusega ruudukujulise sektsiooni ühe otsa kaks vastaskülge on maha lõigatud selliselt, et moodustub kahest tasapinnalise küljega jalast struktuur, mille otsas paikneb 86 mm pikkune terviklik karbikujuline osa. Nende tasapinnaliste külgedega jalgade otsad on lõigatud horisontaalsuuna suhtes 60° all ning on keevitatud alusplaadi külge. Põhisektsiooni ülaosa ühes küljes paikneb pilu laiussega 22 mm ja sügavusega 46 mm nii, et kui rõhuanuma komplekt lastakse allapoole, süüteküünlaga ots ees, siis satub külgharu pilusse. Karbikujulise osa alumise sisepinna külge keevitatakse terasest 30 mm laiune ja 6 mm paksune detail, mis toimib eraldajana. Kaks vastasküljel olevat 7 mm pitskrui hoiavad surveanumat kindlalt paigal. Kaks 12 mm laiust ja 6 mm paksust terasriba, mis on keevitatud karbikujulise sektsiooni põhjale toetuvate külgmiste elementide külge, toetavad surveanumat altpoolt.

▼B

1.6.1.2.2. Süütesüsteem

Süütesüsteem koosneb 25 cm pikkusest Ni/Cr traadist, mille läbimõõt on 0,6 mm ja takistus on 3,85 oom/m. Traat on keritud spiraalina 5 mm läbimõõduga varda abil ja kinnitatud süüteküünla elektrodide külge. Spiraali kaju peaks vastama joonisel 3 toodule. Anuma põhja ja süütespiraali alakülje vaheline kaugus peaks olema 20 mm. Kui elektroode ei saa reguleerida, tuleks süütespiraali ja anuma põhja vahel olevad traadi otsad isoleerida keraamilise kestaga. Traati kuumutatakse püsivoolutoiteallikaga, mis suudab tagada vähemalt 10 A voolutugevuse.

1.6.2. Katse tegemine ⁽¹⁾

Seade, mis on komplekteeritud rõhuanduri ja kuumutussüsteemiga, kuid kuhu ei ole paigaldatud purunevat membraani, toetub altpoolt süüteküünlale. 2,5 g uuritavat vedelikku segatakse keeduklaasis 2,5 g kuivatatud tselluloosiga, kasutades klaasist segamispulka ⁽²⁾. Ohutuse tagamiseks on tegija ja segu vahel segamise ajal kaitseekraan. Kui segu süttib segamise või anuma täitmise ajal, ei ole vaja katsetamist jätkata. Segu lisatakse tilkhaaval väikeste portsjonitena surveanumasse, tagades segu paiknemise ümber süütespiraali ja sellega hea kontakti. On oluline, et spiraal ei deformeeru anuma täitmise ajal, kuna see võib põhjustada väärasid tulemusi ⁽³⁾. Purunev membraan asetatakse kohale ja lukustav kork keeratakse kõvasti kinni. Täidetud anum asetatakse tugiraamile nii, et purunev membraan jääb ülespoole. Tugiraam asetatakse sobivasse armeeritud tõmbekappi või põlemiskambrisse. Toiteallikas ühendatakse süüteküünla välismiste klemmidega ja lülitatakse sisse 10 A vool. Aeg segamise alustamisest kuni voolu sisselülitamiseni ei tohiks ületada kümnet minutit.

Rõhuanduri signaal registreeritakse sobiva süsteemi abil, mis võimaldab nii signaali hindamist kui ka rõhu ajalise sõltuvuse pidevat registreerimist (nt graafilise isekirjutiga ühendatud siirdeprotsesside registraator). Segu kuumutatakse kuni puruneva membraani rebestumiseni või vähemalt 60 s. Kui purunev membraan ei rebestu, tuleks lasta segul jahtuda enne seadme hoolikat lahtimonteerimist, vältides seejuures võimalikku hermeetilisuse kadumist. Uuritava aine ja võrdlusaine(te)ga tehakse viis katset. Fikseeritakse aeg, mis kulub manomeeterrõhu tõusuks 690 kPa-lt 2 070 kPa-le. Arvutatakse keskmine rõhutõusuaeg.

Mõnedel juhtudel võivad ained tekitada rõhutõusu (liiga suurt või liiga väikest), mille põhjuseks on keemilised reaktsioonid, mis ei ole seotud aine oksüdeerimisvõimega. Neil juhtudel võib osutada vajalikuks katse kordamine tselluloosi asemel inertse ainega, nt diatomiidiga (kobediatomiit), et selgitada reaktsiooni olemust.

⁽¹⁾ Oksüdeerijate ja tselluloosi segusid tuleb käsitada plahvatusohtlikena ja käsitleda ettevaatlikult.

⁽²⁾ Praktikas saab seda teha, valmistades 1:1 segu uuritavast vedelikust ja tselluloosist suuremas koguses, kui katseks vaja, ning pannes $5 \pm 0,1$ g surveanumasse. Igaks katseks tuleb segu värskest valmistada.

⁽³⁾ Eelkõige tuleb vältida spiraali naaberkeerdude vahelist kontakti.

▼B**2. ANDMED**

Rõhutõusuajad nii uuritava aine kui ka võrdlusaine(te) puhul. Rõhutõusuajad inertse ainega katsete puhul (kui need on tehtud).

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Arvutatakse keskmised rõhutõusuajad nii uuritava aine kui ka võrdlusaine(te) kohta.

Arvutatakse keskmine rõhutõusuaeg inertse ainega katsete puhul (kui need on tehtud).

Mõned näited tulemuste kohta on toodud tabelis 1.

Tabel 1

Näiteid tulemustest ^(a)

Aine ^(b)	Keskmine rõhutõusu aeg (ms) 1:1 tselluloosisegu puhul
Ammooniumdikromaat, küllastunud vesilahus	20 800
Kaltsiumnitraat, küllastunud vesilahus	6 700
Raud(III)nitraat, küllastunud vesilahus	4 133
Liitiumperkloraat, küllastunud vesilahus	1 686
Magneesiumperkloraat, küllastunud vesilahus	777
Nikkelnitraat, küllastunud vesilahus	6 250
Lämmastikhape, 65 %	4 767 ^(c)
Perkloorhape, 50 %	121 ^(c)
Perkloorhape, 55 %	59
Kaaliumnitraat, 30 % vesilahus	26 690
Hõbenitraat, küllastunud vesilahus	— ^(d)
Naatriumkloraat, 40 % vesilahus	2 555 ^(c)
Naatriumkloraat, 45 % vesilahus	4 133
Inertne aine	
Vesi: tselluloos	— ^(d)

^(a) Vt viidet 1 ÜRO transpordieeskirjade kohase klassifitseerimise kohta.

^(b) Küllastunud lahused tuleks valmistada 20 °C juures.

^(c) Laboritevaheliste võrdluskatsete keskmine väärtus.

^(d) Suurimat rõhku 2 070 kPa ei ole saavutatud.

▼B3. **ARUANDLUS**

3.1. ARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet:

- uuritud aine nimetus, koostis, puhtus jne;
- uuritava aine kontsentratsioon;
- tselluloosi kuivatusmenetlus;
- tselluloosi niiskusesisaldus;
- mõõtetulemused;
- inertse ainega tehtud katsete tulemused, kui need on olemas;
- arvutatud keskmised rõhutõusuajad;
- võimalikud kõrvalekalded nimetatud meetodist ja nende põhjused;
- kogu täiendav teave või märkused, mis on vajalikud tulemuste tõlgendamiseks.

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE ⁽¹⁾

Katsetulemusi hinnatakse

- a) selle põhjal, kas uuritava aine ja tselluloosi segu süttib ise, ja
- b) rõhutõusule (690 kPa-lt 2 070 kPa-le) kulunud keskmise aja võrdlemisel võrdlusaine(te) korral selleks kulunud ajaga.

Vedelikku käsitatakse oksüdeerijana juhul, kui

- a) uuritava aine ja tselluloosi 1:1 segu (massi järgi) süttib iseeneslikult või
- b) uuritava aine ja tselluloosi 1:1 segu (massi järgi) korral on keskmine rõhutõusuaeg väiksem 65 massiprotsendilise lämmastik-happe (vesilahus) ja tselluloosi 1:1 segu (massi järgi) korral saadud keskmisest rõhutõusuajast või on sellega võrdne.

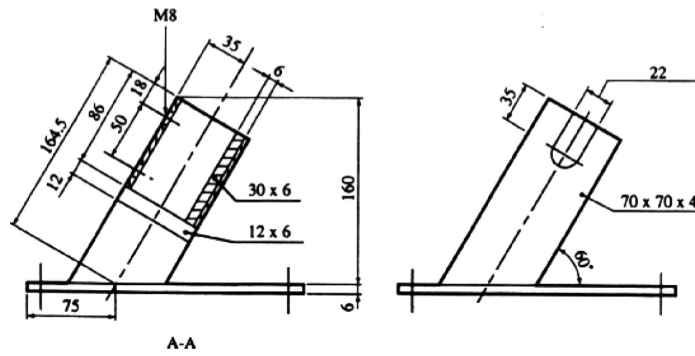
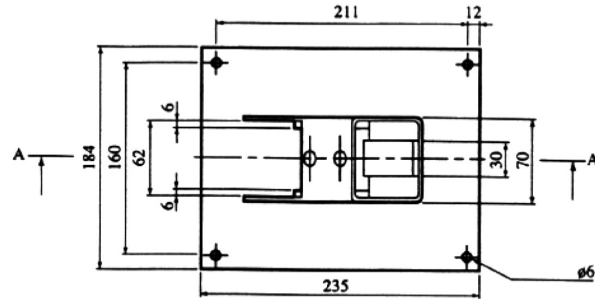
Valepositiivse tulemuse vältimiseks tuleks tulemuste tõlgendamisel arvesse võtta ka tulemusi, mis on saadud aine katsetamisel koos inertse materjaliga.

⁽¹⁾ Vt viide 1, tulemuste tõlgendamine ÜRO transpordieeskirjade kohaselt mitmeid võrdlusaineid kasutades.

▼B

Joonis 2

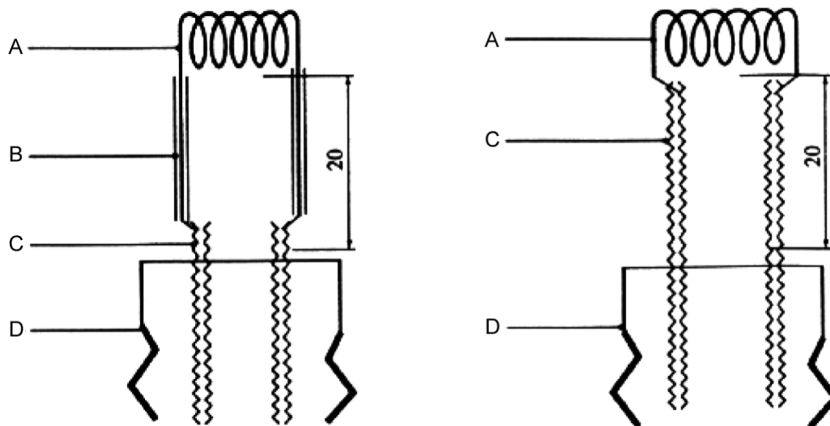
Tugiraam



Joonis 3

Süütesüsteem

- (A) Süütespiraal (B) Isolatsioon (C) Elektroodid (D) Süüteküünal



Märkus: toodud kujutistest võib kasutada emba-kumba.

▼ **M1****A.22. KIUUDE PIKKUSE JÄRGI KAAALUTUD GEOMEETRILINE KESKMIINE DIAAMEETER****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

See meetod kirjeldab protseduuri lahtiste keemiliste mineraalkiudude (MMMF, *Man Made Mineral Fibres*) pikkuse järgi kaalutud geomeetrilise keskmise diameetri (LWGMD, *Length Weighted Geometric Mean Diameter*) mõõtmiseks. Kuna kogumi LWGMD on 95 % tõenäosusega proovi 95 % usalduspiiride vahel (LWGMD \pm kaks standardviga), asub esitatud väärtus (testväärtus) proovi madalamal 95 % usalduspiiril (st LWGMD – kaks standardviga). Meetod põhineb 1994. aasta juunis uuendatud HSE tööstusprotseduuri kavandil, mis kooskõlastati ECFA ja HSE kohtumisel Chesteris 26. septembril 1993 ja mida arendati edasi teise laboritevahelise katse jaoks ja selle põhjal (1, 2). Seda mõõtmismeetodit saab kasutada selliste lahtiste ainete või toodete kiudiametri iseloomustamiseks, mis sisaldavad MMMFisid, kaasa arvatud tulekindlad keraamilised kiud (RCF, *refractory ceramic fibres*), keemilised klaaskiud (MMVF, *man-made vitreous fibres*), kristallilised ja polükristallilised kiud.

Pikkuse järgi kaalumise on viis kompenseerida diameetri jaotumist, mida põhjustab pikkade kiudude murdumine materjalist proovi võtmisel või materjali käsitsemisel. Geomeetrilist statistikat (geomeetrilist keskmist) kasutatakse MMMFide diameetri suuruse järgi jaotumise mõõtmiseks, kuna nende diameetrite jaotus suuruse järgi on tavaliselt lähedane logaritmilisele normaaljaotusele.

Nii pikkuse kui diameetri mõõtmine on tüütu ja aeganõudev, aga kui mõõdetakse vaid neid kiudusid, mis puudutavad lõpmatult peenikest riba skaneeriva elektronmikroskoobi (SEM) vaateväljas, siis on antud kiu valimise tõenäosus võrdeline selle pikkusega. Kuna sellega võetakse arvesse pikkust pikkuse järgi kaalumise arvutustes, on ainus nõutav mõõtmine diameetri mõõtmine ja „LWGMD – kaks standardviga” võib arvutada kirjeldatud viisil.

1.2. MÕISTED

Partikkel – objekt, mille pikkuse-laiuse suhe on vähem kui 3:1.

Kiud – objekt, mille pikkuse-laiuse suhe (formaadisuhe) on vähemalt 3:1.

1.3. RAKENDUSALA JA PIIRANGUD

Meetod on mõeldud vaatlemaks diameetri jaotumisi, keskmise diameetriga alates 0,5 μm kuni 6 μm . Suuremaid diameetreid võib mõõta, kasutades väiksemaid SEMi suurendusi, kuid meetodi täpsus väheneb peenemate kiudude jaotuste puhul ja kui keskmine diameeter on alla 0,5 μm , soovitatakse mõõtmist TEMiga (transmissiooni elektronmikroskoop).

▼ **M1**

1.4. Katsemeetodi põhimõte

Kiu kihist või lahtisest kiumassist võetakse mitu representatiivset südamikuproovi. Lahtiste kiudude pikkust vähendatakse purustava protseduuri abil ja representatiivne osaproov hajutatakse vees. Eraldatakse alikvoodid ja filtreeritakse need läbi 0,2 µm poorisuurusega polükarbonaadifiltri ja valmistatakse ette uurimiseks SEMi tehnikate abil. Kiu diameeter mõõdetakse 10 000-kordse või suurema ekraanisuurendusega, ⁽¹⁾ kasutades erapooletu keskmise diameetri hinnangu andmiseks liini katkestamise meetodit. Arvutatakse madalam 95 % usaldusvahemik (mis põhineb ühepoolisel testil), et anda hinnang materjali kiudiametri geomeetrilise keskmise väikseima väärtuse kohta.

1.5. Katsemeetodi kirjeldus

1.5.1. **Turvalisus/ettevaatusabinõud**

Isiklikku kokkupuudet õhus sisalduvate kiududega tuleks minimeerida ja kuivkiudude käsitsemisel tuleks kasutada tõmbekappi või laminaarboksi. Kontrollmeetodite tõhususe kindlaksmääramiseks tuleks läbi viia korrapäraselt isikliku kokkupuute seiret. MMMFide käsitsemisel tuleb nahaärrituse vähendamiseks ja ristsaastumise ärahoidmiseks kanda ühekordselt kasutatavaid kindaid.

1.5.2. **Seadmed/vahendid**

- Press ja pressvormid (võimelised tekitama 10 MPa).
- 0,2 µm poorisuurusega polükarbonaat-kapillaarfiltrid (25 mm diameetriga).
- 5 µm poorisuurusega tselluloos-ester membraanifilter tugifiltrina kasutamiseks.
- Klaasist filtreermisseadmed (või ühekordselt kasutatavad filtreerimisüsteemid) 25 mm diameetriga filtritele (nt Millipore'i klaasist mikroanalüüsikomplekt, tüüp nr XX10 025 00).
- Värskest destilleeritud vesi, mis on mikroorganismide eemaldamiseks lastud läbi 0,2 µm poorisuurusega filtri.
- Pihusti kuld- või kuld/pallaadiumotsaga.
- Skaneeriv elektronmikroskoop lahutamisevõimega kuni 10 nm ja 10 000-kordse suurendusega.
- Muu: spaatlid, tüüp 24, skalpellitera, pintsetid, SEMi torud, süsinikliim või süsinikeip, kolloidhõbe.
- Ultrahelisond või lauale asetatav ultrahelivann.
- Südamiku proovivõtuvahend või korgipuur südamikuproovide võtmiseks MMMFide kihist.

⁽¹⁾ See suurendusväärtus kehtib 3 µm kiu puhul, 6 µm kiu puhul võib 5 000-kordne suurendus olla sobivam.

▼ M1**1.5.3. Katsemenetlus****1.5.3.1. Proovivõtmine**

Mineraalvilla ja villaku puhul kasutatakse ristlõikest proovide võtmisel 25 mm südamikuproovide võtmise vahendit või korgipuuri. Proovid peaksid olema võrdselt jaotatud kihi laiuse ulatuses või võetud suvalistest kohtadest, kui käepärast on pikki kihte. Samade vahendite abil on võimalik eraldada juhuslikke proove lahtisest kiust. Võimaluse korral tuleks ruumiliste variatsioonide peegeldamiseks lahtises materjalis võtta kuus proovi.

Kuus südamikuproovi purustatakse 50 mm läbimõõduga vormis 10 MPa juures. Materjal segatakse spaatliga ja pressitakse uuesti 10 MPa juures. Seejärel võetakse materjal vormist välja ja säilitatakse seda suletud klaaspudelis.

1.5.3.2. Proovi ettevalmistamine

Orgaanilist sideainet saab vajaduse korral eemaldada, asetades kiu umbes tunniks 450 °C sulatusahju.

Proovi jaotamiseks vormitakse see koonuseks ja lõigatakse see neljaks (seda tuleks teha tolmukapis).

Spaatli abil lisatakse väike hulk (< 0,5 g) proovist 100 ml värskelt destilleeritud veele, mis on lastud läbi 0,2 µm membraaniga filtri (alternatiivina võib kasutada ultrapuhast vett muudest allikatest, kui need vastavad nõuetele). Proov hajutatakse põhjalikult ultrahelisondi abil 100 W võimsuse juures ja seda pööratakse nii, et tekiks kavitatsioon. (Kui sondi pole käepärast, kasutada järgmist meetodit: proovi raputatakse ja pööratakse korduvalt ümber 30 sekundi jooksul; hoitakse viis minutit lauale asetavas ultrahelivannis; seejärel raputatakse ja pööratakse korduvalt veel 30 sekundi jooksul).

Kohe pärast kiu hajutamist eemaldatakse teatud arv alikvoote (näit kolm 3, 6 ja 10 ml alikvooti), kasutades laiasuulist pipetti (2–5 ml mahutavusega).

Iga alikvoot vaakumfiltreeritakse läbi 0,2 µm polükarbonaatfiltri, mida toetab 5 µm poorisuurusega MEC-tugifilter, kasutades 25 mm klaasist filterletrit silindrilise mahutiga. Umbkaudu 5 ml filtreeritud destilleeritud veest tuleks asetada lehtrisse ja alikvoot aeglaselt vette pipettida, hoides pipetiotsa allpool meniskit. Peale pipettimist tuleb pipett ja veemahuti põhjalikult läbi loputada, kuna peenikesed kiud kipuvad jääma pinnale.

Filter eemaldatakse hoolikalt ja eraldatakse see tugifiltrist enne mahutisse kuivama asetamist.

▼ **M1**

Filtreeritud osast lõigatakse veerand või pool tüüp 24 skalpelliga edasi-tagasi liigutuste abil. Lõigatud osa kinnitatakse ettevaatlikult SEMi esemelaua külge süsinikteibi või süsinikliimi abil. Kolloidhõbedat tuleks lisada vähemalt kolme kohta, et parandada elektrilist kontakti filtri ja esemelaua äärtel. Kui liim/kolloidhõbe on kuiv, pihustada proovi pinnale umbes 50 nm kulla või kulla/pallaadiumi kiht.

1.5.3.3. *SEMi kalibreerimine ja kasutamine*1.5.3.3.1. *Kalibreerimine*

SEMi kalibreerimist tuleks kontrollida vähemalt kord nädalas (ideaaljuhul kord päevas), kasutades sertifitseeritud kalibreerimisvõret. Kalibreerimist tuleks kontrollida sertifitseeritud standardi alusel ja kui mõõdetud väärtus (SEM) ei jää $\pm 2\%$ sisse sertifitseeritud väärtusest, siis tuleb SEM-kalibreerimist kohandada ja uuesti kontrollida.

SEM peaks olema võimeline lahendama vähemalt minimaalselt nähtava diameetri 0,2 μm , kasutades tegelikku proovimatriksit, 2 000-kordse suurendusega.

1.5.3.3.2. *Kasutamine*

SEM peaks töötama 10 000-kordse suurenduse ⁽¹⁾ juures tingimustel, mis annavad hea lahutusvõime lubatava kujutise aeglasel skaneerimiskiirusel, näiteks 5 sekundit kaadri kohta. Kuigi erinevate SEMide kasutamissoodused võivad varieeruda, tuleks suhteliselt väikese aatommassiga materjalide korral üldiselt parima nähtavuse ja resolutsiooni saavutamiseks kasutada kiirendavat pinget 5–10 keV, väikest laotuspunkti seadistust ja lühikest töökaugust. Lineaarse skaneerimise puhul tuleb kasutada 0° kallet, et minimeerida refokuseerimine, või kui SEMil on võimalik kohaldada kõrgust, tuleks kasutada kohaldatud kõrgusega töökaugust. Võib kasutada väiksemat suurendust, kui materjal ei sisalda väikseid (väikese diameetriga) kiude ja kiudude diameeter on suur ($> 5 \mu\text{m}$).

1.5.3.4. *Suuruse järgi sorteerimine*1.5.3.4.1. *Väikese suurendusega uurimine proovi hindamiseks*

Algselt tuleks proovi uurida väikese suurendusega, et otsida tõendust suurte kiudude pundarde kohta ning hinnata kiutihedust. Juhul kui moodustub liiga palju puntraid, on soovitatav ette valmistada uus proov.

Statistilise täpsuse jaoks on vaja mõõta miinimumarv kiude ja suur kiutihedus võib tunduda soovitatav, kuna tühjade väljade uurimine on aeganõudev ega oma analüüsi jaoks väärtust. Kui aga filter on üle koormatud, muutub kõigi mõõdetavate kiudude mõõtmine siiski raskeks, ja kuna väikesed kiud võivad jääda suuremate varju, võivad need jääda kahe silma vahele.

⁽¹⁾ 3 μm kiudude korral vt eelmist märkust.

▼ **M1**

Kalduvus LWGMD ülehindamisele võib tuleneda kiutihedustest enam kui 150 kiudu millimeetri kohta lineaarse sammu puhul. Teisest küljest pikendab väike kiukontsentratsioon analüüsi aega ja sageli on mõistlikum valmistada ette proov, mille kiutihendus on lähedasem optimaalsele, kui jätkata madala kontsentratsiooniga filtrite loendamist. Optimaalne kiutihedus peaks andma keskmiselt üks või kaks loendatavat kiudu vaatevälja kohta 5 000-kordse suurendusega. Siiski sõltub optimaalne tihedus kiudude suurusest (diameetrist), nii et on vajalik, et operaator kasutaks teatavat eksperdi hinnangut otsustamaks, kas kiu tihedus on optimaalse lähedane või mitte.

1.5.3.4.2. Kiu diameetri kaalumine pikkuse järgi

Loendatakse vaid kiude, mis puudutavad (lõpmatult) peenikest SEMi ekraanile tõmmatud joont (või lõikuvad sellega). Selleks on ekraani keskele tõmmatud horisontaalne (või vertikaalne) joon.

Alternatiivina võib ekraani keskele asetada üksiku punkti ja alustada pidevat skaneeringut ühes suunas üle filtri. Mõõdetakse ja salvestatakse iga sellise kiu diameeter, mille formaadisuhe on suurem kui 3:1 ja mis puudutab või ületab seda punkti.

1.5.3.4.3. Kiudude sorteerimine suuruse järgi

Soovitav on mõõta minimaalselt 300 kiudu. Iga kiudu mõõdetakse ainult korra ja selles punktis, kus ta lõikub kujutisele paigutatud joone või punktiga (või lõikumiskoha lähedal, kui kiu servad on hägused). Kui leidub ebauhtlase põiklõikega kiude, tuleks kasutada mõõtmist, mis vastab kiu keskmisele diameetrile. Hoolikas tuleb olla kiuservade määratlemisel ja nende vahelise lühima kauguse mõõtmisel. Sorteermist võib läbi viia *on-line* või *off-line* salvestatud kujutistel või fotodel. Soovitav on kasutada poolautomatiseeritud kujutise mõõtmise süsteeme, mis laadivad andmed otse arvutustabelisse, kuna need säästavad aega ja välistavad ümberkirjutusvead ning arvutusi on võimalik automatiseerida.

Pikkade kiudude otsi tuleks kontrollida väikese suurendusega, et välistada nende tagasikeerdumine mõõtmise vaatevälja ja tagada, et neid mõõdetakse ainult üks kord.

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Kiudiametritel ei esine tavaliselt normaaljaotust. Siiski on logaritmiselise abil võimalik saavutada normaaljaotusele lähenev jaotus.

Arvutatakse n kiudiametri (D) naturaallogaritmide ($\ln D$) aritmeetiline keskmine (keskmine $\ln D$) ja standardhälve ($SD_{\ln D}$).

$$\text{keskmine } \ln D = \frac{\sum \ln D}{n} \quad (1)$$

▼ M1

$$SD_{\ln D} = \sqrt{\frac{\sum (\ln D - \text{keskmise } \ln D)^2}{n - 1}} \quad (2)$$

Standardhälve jagatakse mõõtmiste arvu (n) ruutjuurega, et saada standardviga ($SE_{\ln D}$).

$$SE_{\ln D} = \frac{SD}{\sqrt{n}} \quad (3)$$

Keskmisest lahutatakse kahekordne standardviga ja arvutatakse selle väärtuse eksponent (keskmise miinus kaks standardviga), et saada geomeetriline keskmine miinus kaks geomeetrilist standardviga.

$$LWGMD - 2SE = e^{(\text{keskmise } \ln D - 2SE_{\ln D})} \quad (4)$$

3. ARUANDMINE**KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks sisaldama vähemalt järgmist teavet:

- avaldise $LWGMD - 2SE$ väärtus;
- mis tahes hälbed ja eriti need, mis võivad avaldada mõju tulemuste täpsusele, koos piisavate põhjendustega.

4. VIITED

- 1) B. Tylee SOP MF 240. Health and Safety Executive. Veebruar 1999.
- 2) G. Burdett ja G. Revell. Development of a standard method to measure the length-weighted 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 JAOTUSKOEFIITSIENT (SÜSTEEMIS 1-OKTANOOL-VEESI):
AEGLAISE SEGAMISE MEETOD****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 123 (2006). Aeglase segamise meetodiga saab täpselt määrata jaotuskoeffitsientide süsteemis 1-oktanool-vesi (P_{OW}) kuni $\log P_{OW}$ väärtuseni 8,2 (1). Sellepärast sobib see meetod väga hüdrofoobsete ainete P_{OW} otseks katseliseks määramiseks.
2. Muud meetodid jaotuskoeffitsientide määramiseks süsteemis 1-oktanool-vesi (P_{OW}) on loksutatava kolvi meetod (2) ja P_{OW} määramine pööratud faasi kõrgefektiivse vedelikkromatograafia retentsioonaja andmetest (3). Loksutatava kolvi meetod võib anda vale tulemuse, kuna veefaasi kanduvad üle mikroskoopilised oktanooli piisakesed. Mida suurem on P_{OW} väärtus, seda rohkem kiputakse veefaasis olevate oktanooli mikropiiskade tõttu ülehindama uuritava aine kontsentratsiooni vees. Sellepärast võib loksutatava kolvi meetodit kasutada ainult ainete puhul, mille $\log P_{OW} < 4$. Teine meetod põhineb otse määratud usaldusväärsusel P_{OW} väärtustel, mida kasutatakse kõrgefektiivse vedelikkromatograafia retentsioonaja ja mõõdetud P_{OW} väärtuste vahelise seose kalibrimiseks. Mõnda aega oli kättesaadav OECD katsejuhendi kavand (4) ioniseeruvate ainete jaotuskoeffitsientide määramiseks süsteemis 1-oktanool-vesi, kuid seda meetodit enam ei kasutata.
3. Käesolev katsemeetod on välja töötatud Madalmaades. Siin kirjeldatud meetodite täpsust on kontrollitud ja optimeeritud laboritevaheliste võrdluskatsete uuringuga, milles osales 15 laborit (5).

LÄHTEKAALUTLUSED**Olulisus ja kasutamine**

4. On kindlaks tehtud, et inertsete orgaaniliste ainete bioakumulatsioon kalades korreleerub väga tugevasti nende ainete jaotuskoeffitsiendiga süsteemis 1-oktanool-vesi (P_{OW}). Lisaks on näidatud, et P_{OW} korreleerub kemikaalide toksilise mõjuga kaladele ning seostumisega tahkete ainetega, nagu pinnas ja setted. Ulatuslik ülevaade nendest seostest on esitatud publikatsioonis 6.
5. On kindlaks tehtud, et aine 1-oktanool-vee-süsteemi jaotuskoeffitsiendi ja muude omaduste vahel on palju keskkonnatoksikoloogia ja -keemia seisukohast olulisi seoseid. Sellepärast on jaotuskoeffitsient süsteemis 1-oktanool-vesi saanud tähtsaks parameetriks, mille abil hinnatakse kemikaalide keskkonnaohtlikkust ja ennustatakse nende käitumist keskkonnas.

Kasutusala

6. Aeglane segamine peaks vähendama 1-oktanooli mikropiiskaste moodustumist veefaasis olevatest 1-oktanooli tilkadest. Sellega välditakse aine kontsentratsiooni ülehindamist veefaasis mikropiiskades leiduvate uuritava aine molekulide tõttu. Seepärast on aeglase segamise meetod eriti sobiv P_{OW} määramiseks ainetel, mille eeldatav $\log P_{OW}$ väärtus on 5 või suurem ja mille puhul loksutatava kolvi meetod (2) võib anda vale tulemuse.

▼M4

MÕISTED JA ÜHIKUD

7. Aine jaotuskoeffitsient vee ja lipofiilse lahusti (1-oktaanol) vahel iseloomustab kemikaali tasakaalulist jaotumist kahe faasi vahel. Aine jaotuskoeffitsient vee ja lipofiilse lahusti (1-oktaanol) vahel (P_{OW}) on suhe, mis saadakse veega küllastunud 1-oktaanooli faasis oleva uuritava aine tasakaalulise kontsentratsiooni (C_O) jagamisel 1-oktaanooliga küllastunud veefaasis oleva uuritava aine tasakaalulise kontsentratsiooniga (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Kuna jaotustegur on kontsentratsioonide suhe, on see mõõtühikuta suurus. Enamasti väljendatakse seda kümnendlogaritmi kujul ($\log P_{OW}$). P_{OW} sõltub temperatuurist, sellepärast tuleb andmete esitamisel märkida ka mõõtmistemperatuur.

MEETODI PÕHIMÕTE

8. Jaotuskoeffitsiendi määramiseks tasakaalustatakse püsival temperatuuril omavahel vesi, 1-oktaanol ja uuritav aine. Seejärel määratakse uuritava aine kontsentratsioon mõlemas faasis.
9. Siin kirjeldatavas aeglase segamise katses on võimalik vähendada eksperimentaalseid raskusi, mida loksutatava kolvi katses põhjustab mikropiiskade tekkimine. Aeglase segamise katses tasakaalustatakse vesi, 1-oktaanol ja uuritav aine termostateeritavas ja segajaga varustatud katsenõus. Aine jaotumist faaside vahel kiirendab segamine. Segamine tekitab piiratud turbulentsi, mis kiirendab jaotumist 1-oktaanooli ja vee vahel, kuid seejuures ei teki mikropiisku (1).

KATSE RAKENDATAVUS

10. Kuna lisandid võivad mõjutada uuritava aine aktiivsuskoeffitsienti, määratakse jaotuskoeffitsient ainult puhta aine jaoks. 1-oktaanooli ja vee vahel jaotumise uurimisel tuleb kasutada müügilolevaid kõrgeima puhtusastmega kemikaale.
11. Käesolev meetod on rakendatav puhta aine korral, mis ei dissotsieeru, assotsieeru ega ole märkimisväärselt pindaktiivne. Meetodit võib kasutada selliste ainete ja nende segude 1-oktaanooli ja vee vahel jaotumise suhte määramiseks. Kui meetodit kasutatakse segu puhul, on määratav 1-oktaanooli ja vee vahel jaotumise suhe tinglik ja oleneb uuritava segu ning veefaasina kasutatava elektrolüüdi keemilisest koostisest. Täiendavate abinõude rakendamisel võib seda meetodit kasutada ka dissotsieeruvate või assotsieeruvate ühendite puhul (vt punkt 12).
12. Kuna dissotsieeruvate ainete, nagu orgaanilised happed, fenoolid, orgaanilised alused ja metallorgaanilised ühendid, jaotumisel 1-oktaanooli ja vee vahel kujuneb vees ja 1-oktaanoolis mitmeastmeline tasakaal, on jaotuskoeffitsient süsteemis 1-oktaanol-vesi tinglik konstant, mis sõltub tugevasti elektrolüüdi koostisest (7, 8). Seega eeldab jaotuskoeffitsiendi määramine süsteemis 1-oktaanol-vesi, et katse jooksul kontrollitakse pH väärtust ja elektrolüüdi koostist ning esitatakse need andmed. Nende jaotuskoeffitsientide hinnangulise väärtuse saamiseks kasutatakse eksperdihindamist. Dissotsiatsioonikonstandi (-konstantide) alusel valitakse sobivad pH väärtused, et määrata iga ionsatsiooniastme jaotuskoeffitsient. Metallorgaaniliste ühendite jaotumise uurimisel kasutatakse puhvreid, mis ei moodusta komplekse (8). Arvestades vesilahuste keemia andmeid (komplekside moodustumise tasakaalukonstandid, dissotsiatsioonikonstandid), valitakse katsetingimused nii, et oleks võimalik hinnata, millises vormis on uuritav aine veefaasis. Kõikide katsete puhul luuakse taustelektrolüüdi abil ühesugune ioonne jõud.

▼ **M4**

13. Veēs vähe lahustuvate või suure P_{OW} väärtusega ainete jaotuskoeffitsiendi määramist võib raskendada see, et aine väikest kontsentratsiooni vees on raske täpselt määrata. Käesolevas metoodikas antakse juhendeid, kuidas seda probleemi lahendada.

ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

14. Keemilised reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad või veelgi kõrgema puhtusastmega. Uuritava aineena soovitatakse kasutada teadaoleva keemilise koostisega vähemalt 99-protsendilise puhtusastmega radioaktiivse märgiseta aineid või teadaoleva keemilise koostise ja radiokeemilise puhtusastmega radioaktiivselt märgistatud aineid. Kui märgise poolestusaeg on lühike, tehakse isotoobi lagunemist arvestav parand. Radioaktiivse märgisega uuritava aine puhul tuleb ainespetsiifilise analüüsimeetodiga tõendada, et mõõdetav radioaktiivsus on otse seotud uuritava ainega.
15. $\log P_{OW}$ hinnangu saamiseks võib kasutada müügilolevat $\log P_{OW}$ hindamiseks ette nähtud tarkvara või kasutada kummaski lahustis lahustuvuste suhet.
16. Enne aeglase segamise katse korraldamist P_{OW} määramiseks peaks uuritava aine kohta teadma järgmist:
- struktuurivalem,
 - analüüsimeetodid, mis sobivad uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks vees ja 1-oktanoolis,
 - ioniseeruva aine dissotsiatsioonikonstandid (OECD juhis 112 (9)),
 - lahustuvus vees (10),
 - abiootiline hüdrolüüs (11),
 - kiire biolagunduvus (12),
 - aururõhk (13).

MEETODI KIRJELDUS**Seadmed ja aparatuur**

17. Vaja on harilikku laborivarustust, eeskätt järgmisi vahendeid:
- magnetsegajad ja tefloniga kaetud segamispulgad, mida kasutatakse veefaasi segamiseks;
 - analüüsiseadmed, mis võimaldavad määrata uuritava aine eeldatavaid kontsentratsiooni väärtusi;
 - katsenõu, mille põhja juures on kraan. Olenevalt $\log P_{OW}$ hinnangulisest väärtusest ja uuritava aine avastamise lävest tuleb vajaduse korral kasutada suuremat kui üheliitri mahuga, kuid samasuguse kujuga katsenõu, et saaks võtta piisava koguse vett uuritava aine keemiliseks eraldamiseks ja määramiseks. Nii saadakse aine veest eraldamisel suurema sisaldusega kontsentraat ja usaldusväärsem analüüsi tulemus. 1. liite tabelis on esitatud vajaliku minimaalse mahu hinnangud, uuritava aine avastamise läved, hinnangulised $\log P_{OW}$ väärtused ja lahustuvused vees. Tabel põhineb Pinsuwani jt (14) esitatud seosel ühelt poolt $\log P_{OW}$ ning teiselt poolt oktanoolis ja vees lahustuvuse (S) suhte vahel:

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

▼ **M4**

kus

$SR = S_{\text{oct}}/S_w$ (väljendatud molaarsustes),

ning Lymani (15) esitatud valemil, mis võimaldab ennustada vesilahustuvust. 1. liites esitatud valemi abil arvutatud vesilahustuvust tuleb käsitleda esialgse hinnanguna. Tuleb märkida, et käesoleva meetodi kasutaja võib hinnata vesilahustuvust ka mis tahes muu valemi abil, kui ta arvab, et see kajastab hüdrofoobsuse ja lahustuvuse seost paremini. Näiteks tahkete ühendite puhul on soovitatav lahustuvuse hindamisel arvestada ka sulamistemperatuuri. Kui kasutatakse modifitseeritud valemite, tuleb kontrollida, kas valem lahustuvuse arvutamiseks oktanoolis ikkagi kehtib. 2. liites on skemaatiliselt kujutatud klaasist veesärgiga katsenõu mahuga umbes üks liiter. 2. liites kujutatud nõu proportsioonid on osutunud sobivaks ja muu mahuga nõu peaks olema samasuguse kujuga;

— oluline on sellise seadme olemasolu, mis hoiab aeglase segamise katse jooksul püsivat temperatuuri.

18. Nõud peavad olema valmistatud inertsest materjalist, et adsorptsioon nõu pinnale oleks tähtsusetu.

Katselahuste valmistamine

19. P_{OW} määramiseks kasutatakse müügilolevat suurima puhtusastmega (vähemalt üle 99 %) 1-oktanooli. 1-oktanool soovitatakse puhastada happe, aluse ja veega ekstraheerimise abil ning seejärel kuivatada. Lisaks sellele võib 1-oktanooli puhastada destilleerimisega. Puhastatud 1-oktanooli kasutatakse uuritava aine standardlahuste valmistamiseks. P_{OW} määramiseks kasutatav vesi peab olema destilleeritud klaas- või kvartsklaasist seadme abil, saadud puhastussüsteemist või olema kõrgefektiivse vedelikkromatograafia puhul nõutava puhtusega. Destilleeritud vesi filtritakse läbi filtri, mille poori suurus on 0,22 µm, ja tehakse pimekatsed, millega kontrollitakse, et kontsentreeritud ekstraktis ei oleks uuritava aine käitumist mõjutavaid lisandeid. Klaas-kiudfiltri kasutamisel puhastatakse see eelnevalt kuumutamise ja vähemalt kolme tunni jooksul 400 °C juures.
20. Enne katset küllastatakse mõlemad lahustid vastastikku, tasakaalustades neid piisavalt suure nõus. Selleks segatakse kahefaasilist süsteemi aeglaselt kahe ööpäeva jooksul.
21. Valitakse vajalik uuritava aine kontsentratsioon ja aine lahustatakse veega küllastunud 1-oktanoolis. Jaotuskoeffitsient süsteemis 1-oktanool-vesi tuleb määrata lahja 1-oktanool- ja vesilahuse jaoks. Sellepärast ei tohi uuritava aine kontsentratsioon ületada 70 % selle lahustuvusest kummaski faasis ega olla suurem kui 0,1 (1). Katses kasutatavas 1-oktanooli lahuses ei tohi olla uuritava aine hõljuvaid tahkeid osakesi.
22. Vajalik kogus uuritavat ainet lahustatakse veega küllastunud 1-oktanoolis. Kui võib arvata, et log P_{OW} väärtus on suurem kui viis, tuleb hoolikalt jälgida, et katses kasutatavad 1-oktanooli lahused ei sisaldaks uuritava aine hõljuvaid tahkeid osakesi. Nende ainete puhul, mille log $P_{OW} > 5$, toimitakse seepärast järgmisel viisil:

— uuritav aine lahustatakse veega küllastunud 1-oktanoolis;

▼ **M4**

- lahusel lastakse piisavalt kaua seista, et hõljuv aine sadestuks. Sadestumise ajal jälgitakse uuritava aine kontsentratsiooni;
- kui 1-oktanooli lahuses mõõdetav kontsentratsioon on saavutanud püsiva väärtuse, lahjendatakse põhilahus vajaliku mahu 1-oktanooli lisamisega;
- mõõdetakse lahjendatud põhilahuse kontsentratsioon. Lahjendatud põhilahust võib aeglase segamise katses kasutada, kui mõõdetud kontsentratsiooni väärtus vastab lahjendusele.

Proovide ekstraheerimine ja analüüsimine

23. Uuritava aine määramiseks kasutatakse valideeritud analüüsimeetodit. Uurija peab esitama tõendid, et katses kasutatavad uuritava aine kontsentratsioonid veega küllastunud 1-oktanoolis ja 1-oktanooliga küllastunud vees on suuremad kui kasutatava analüüsimeetodi mõõtmislävi. Kui on vaja kasutada ekstraheerimismeetodit, tuleb enne katset kindlaks teha vee faasis ja 1-oktanooli faasis oleva uuritava aine analüütilise määramise saagis. Analüüsiks kasutatava signaali tugevus peab olema parandatud pimekatses saadud signaali arvestamiseks; hoolikalt jälgitakse, et analüüsitava ainet ei kantaks üle ühest proovist teise.
24. Kuna hüdrofoobse uuritava aine kontsentratsioon vee faasis on väike, on vee faasi enne analüüsi tõenäoliselt vaja ekstraheerida orgaanilise lahustiga ja ekstrakti kontsentreerida. Samal põhjusel on vaja kontsentreerida võimalikke pimekatseid. Selleks tuleb kasutada kõrgpuhtaid lahusteid, eelistatavalt selliseid, mis sobivad kasutamiseks jääkide analüüsis. Töötamine hoolikalt puhastatud (lahustiga pestud või kõrgel temperatuuril kuumutatud) klaasnõudega aitab vältida ühe proovi saastamist teise prooviga.
25. $\log P_{OW}$ hinnangulise väärtuse saamiseks võib kasutada hindamisprogrammi või eksperdihindamist. Kui hinnangu järgi on väärtus suurem kui kuus, tuleb pimekatse parandite arvestamisel ja analüüsitava aine võimaliku ülekande vältimisel olla eriti hoolikas. Kui hinnanguline $\log P_{OW}$ on suurem kui kuus, tuleb määramise saagist arvestava parandi saamiseks kasutada asendavat standardainet, nii et oleks võimalik saavutada suurt eelkontsentreerimistegurit. Müügil on mitu P_{OW} hindamiseks ette nähtud tarkvaraprogrammi, ⁽¹⁾ nt Clog P (16), KOWWIN (17), ProLogP (18) ja ACD log P (19). Hindamisviise on kirjeldatud publikatsioonides 20–22.
26. Tunnustatud meetodite abil tehakse kindlaks uuritava aine mõõtmisläve väärtused 1-oktanoolis ja vees. Rusikareeglina võib meetodi mõõtmisläve määratleda kui uuritava aine sellist kontsentratsiooni vees või 1-oktanoolis, mille puhul signaali ja müra taseme suhe on kümme. Valitakse sobiv ekstraheerimise ja eelkontsentreerimise meetod ning leitakse analüütilise määramise saagis. Analüütiliseks määramiseks vajaliku tugevusega signaali saamiseks valitakse sobiv eelkontsentreerimistegur.

⁽¹⁾ See teave on ette nähtud üksnes kasutaja abistamiseks. Võib kasutada ka muid samaväärseid arvutiprogramme, kui saab näidata, et need annavad samad tulemused.

▼ **M4**

27. Analüüsimetodi parameetrite ja oodatavate kontsentratsioonide alusel määratakse kindlaks ligikaudne proovi maht, mis on vajalik uuritava aine täpseks määramiseks. Tuleb vältida liiga väikeste veeproovide kasutamist, mis ei anna piisavalt tugevat analüütilist signaali. Tuleb hoiduda ka ülemäära suurte veeproovide võtmisest, kuna sel juhul võib vett mitte jätkuda nõutava minimaalse arvu ($n = 5$) analüüside tegemiseks. 1. liites on esitatud proovi väikseima mahu sõltuvus nõu mahust, uuritava aine avastamise lävest ja lahustuvusest.
28. Uuritava aine sisaldus mõõdetakse selle aine kaliibrimiskõvera võrdlemise teel. Standardproovide kontsentratsioonivahemik peab ulatuma uuritava proovi kontsentratsioonist mõlemale poole.
29. Kui uuritava aine hinnanguline $\log P_{OW}$ väärtus on suurem kui kuus, tuleb enne ekstraheerimist lisada veeproovile asendavat standardainet, et osata arvesse võtta kadusid veeproovi ekstraheerimisel ja eelkontsentreerimisel. Määramise saagist arvestava parandi õige väärtuse saamiseks peavad asendava standardaine omadused olema uuritava aine omadustega väga sarnased või identsed. Selleks kasutatakse eelistatavalt (stabiilsete) isotoopidega (nt deuterium või ^{13}C) märgistatud uuritava aine analooge. Kui stabiilsete isotoopidega (nt deuterium või ^{13}C) märgistatud analooge kasutada ei saa, tuleb usaldusväärsete kirjandusandmete põhjal näidata, et asendava standardaine füüsikalised-keemilised omadused on väga sarnased uuritava aine omadustega. Vee faasi ekstraheerimisel lahustiga võib moodustuda emulsioon. Emulsiooni vähendamiseks võib lisada soola ja lasta faasidel eralduda järgmise päevani. Ekstraheerimiseks ja proovide eelkontsentreerimiseks kasutatud meetodid märgitakse katseprotokollis.
30. Vajaduse korral võib enne analüüsi 1-oktanolis faasist võetud proovi lahjendada sobiva lahustiga. Asendava standardaine lisamine saagist arvestava parandi saamiseks on soovitatav ka siis, kui uuritava aine saagisekatsete tulemused on väga varieeruvad (suhteline standardhälve $> 10\%$).
31. Analüüsimetodi üksikasjad märgitakse katseprotokollis. Nende hulka kuuluvad ekstraheerimismeetod, eelkontsentreerimis- ja lahjendustegur, analüüsiseadme parameetrid, kaliibrimismeetod, kaliibrimise kontsentratsioonivahemik, vee faasis oleva uuritava aine määramise saagis, asendava standardaine lisamine saagist arvestava parandi saamiseks, fooni tase, avastamislävi ja mõõtmislävi.

Katse läbiviimine*Optimaalne 1-oktanolis ja vee mahu suhe*

32. Vee ja 1-oktanolis mahtude valimisel tuleb arvestada mõõtmisläve väärtust 1-oktanolis ja vees, veeproovide puhul kasutatavaid eelkontsentreerimistegureid, 1-oktanolis ja vee prooviks võetavaid koguseid ja eeldatavaid kontsentratsioone. Tehnilistel põhjustel valitakse 1-oktanolis maht aeglaselt segatavas süsteemis sellisel, et 1-oktanolis kiht oleks küllalt paks (üle 0,5 cm), nii et 1-oktanolis faasist saaks võtta proovi seda faasi häirimata.
33. Ühendite puhul, mille $\log P_{OW}$ on 4,5 või suurem, kasutatakse tavaliselt järgmist faaside suhet: üheliitrisse nõusse pannakse 950–980 ml vett ja 20–50 ml 1-oktanolis.

▼ **M4***Katsetingimused*

34. Katse ajal termostateeritakse katsenõu nii, et temperatuurikõikumised on väiksemad kui 1 °C. Katse tuleb teha 25 °C juures.
35. Katsesüsteemi kaitsmiseks päevavalguse eest tehakse katse pimedas ruumis või kaetakse katsenõu alumiiniumfooliumiga.
36. Katse tehakse võimalikult tolmuvabas keskkonnas.
37. 1-oktanooli ja vee süsteemi segatakse tasakaalu saabumiseni. Tasakaalustamisaja hindamiseks tehakse eeluuring, mille jooksul süsteemi segatakse aeglaselt ning võetakse perioodiliselt 1-oktanoolist ja veest proove. Proove võetakse mitte sagedamini kui viie tunni tagant.
38. Iga P_{OW} määramiseks tehakse vähemalt kolm sõltumatut aeglase segamise katset.

Tasakaalustamisaja määramine

39. Eeldatakse, et tasakaal on saavutatud, kui 1-oktanooli faasi ja veefaasi kontsentratsioonide suhte ja aja regressioonisirge tõus nelja järjestikuse proovivõtu ulatuses ei erine oluliselt nullist usaldusnivool 0,05. Enne proovivõtu alustamist tasakaalustatakse süsteemi vähemalt üks ööpäev. Kogemused näitavad, et kui aine hinnanguline $\log P_{OW}$ väärtus on alla viie, saab proovid võtta teisel ja kolmandal päeval. Hüdrofoobsemate ühendite puhul võib tasakaalustamine kesta kauem. Ühendi puhul, mille $\log P_{OW}$ väärtus on 8,23 (dekaklorobifenüül), oli piisav tasakaalustamisaeg 144 tundi. Tasakaalu hindamiseks võetakse korduvalt proove ühest nõust.

Katse alustamine

40. Katse alguses täidetakse katsenõu veega, mis on küllastunud 1-oktanooliga. Püsiva temperatuuri saavutamiseks termostateeritakse katsenõu piisava aja jooksul.
41. Katsenõusse lisatakse ettevaatlikult vajalik kogus uuritavat ainet, mis on eelnevalt lahustatud sobivas mahus veega küllastunud 1-oktanoolis. See etapp on väga oluline, kuna siin tuleb vältida kahe faasi turbulentset segunemist. Selleks võib 1-oktanooli faasi lisada aeglaselt pipetiga, hoides pipetti vastu katsenõu seina veefaasi pinna läheduses. 1-oktanooli faas voolab mööda klaasseina, moodustades veefaasi peale kihi. Mingil juhul ei tohi 1-oktanooli kallata otse katsenõusse; 1-oktanooli tilgad ei tohi kukkuda otse vette.
42. Pärast segamise alustamist tõstetakse segamise kiirust aeglaselt. Kui segaja mootorit ei saa vajalikul määral reguleerida, tuleb kasutada trafot. Segamise kiirus reguleeritakse selliseks, et vee ja 1-oktanooli piirpinnal tekiks 0,5–2,5 cm sügavune keeris. Kui keerise sügavus ületab 2,5 cm, tuleb segamise kiirust vähendada; vastasel korral võivad 1-oktanooli tilkadest veefaasis tekkida mikropiisakesed, mille tagajärjel uuritava aine kontsentratsiooni vees hinnatakse tegelikust suuremaks. Maksimaalselt 2,5 cm sügavusele keerisele vastavat segamiskiirust soovitatakse laboritevaheliste võrdluskatsete tulemuste alusel (5). See on kompromiss, mis võimaldab 1-oktanooli mikropiiskade tekke piiramisega samal ajal süsteemi kiiresti tasakaalustada.

▼ **M4***Proovi võtmine ja ettevalmistamine*

43. Enne proovi võtmist peatatakse segaja ja oodatakse, kuni vedelike liikumine lakkab. Kui proovid on võetud, pannakse segaja uuesti aeglaselt tööle, nagu eespool kirjeldatud, ja seejärel suurendatakse järk-järgult segamise kiirust.
44. Vee proove võetakse katsenõu alumises osas oleva kraani kaudu. Kraani sees olev tasakaalustamata veekogus visatakse alati ära (2. liites kujutatud nõu puhul on selle maht umbes 5 ml). Kraani sees olev vesi ei segune ülejäänud faasiga ega ole sellepärast tasakaalus. Registreeritakse veeproovide mahud ja jälgitakse, et massibilansi koostamisel võetaks arvesse ka äravisatud vees leiduv uuritava aine kogus. Aurumiskao vähendamiseks lastakse veel rahulikult voolata jaotuslehtrisse, nii et vee- ja 1-oktaanoolikihi olekut ei häiritaks.
45. 1-oktaanooli proove võetakse 1-oktaanooli kihist väikeste alikvootide (umbes 100 µl) kaupa 100-mikroliitrise tervenisti klaasist ja metallist süstla abil. Seejuures jälgitakse, et ei häiritaks faasidevahelist piirpinda. Registreeritakse proovide mahud. Väiksest alikvoodist piisab, kuna 1-oktaanooli proovi lahjendatakse.
46. Tuleb vältida asjatuid proovi ülekandmisi. Seepärast määratakse proovi maht gravimeetriliselt. Veeproovi puhul saab seda teha nii, et proov võetakse jaotuslehtrisse, millesse on enne pandud vajalik kogus lahustit.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

47. Käesoleva katseteetodika kohaselt tehakse P_{OW} määramiseks uuritava ainega ühesugustes tingimustes kolm aeglase segamise katset (kolm paralleelkatset). Tasakaalu saavutamist näitav regressioonikõver peab põhinema C_O/C_W määramisel vähemalt neljas järjestikuses eri aegadel võetud proovis. See võimaldab arvutada dispersiooni, mis iseloomustab paralleelkatsetest leitud keskvaartuse määramatust.
48. P_{OW} väärtust võib iseloomustada igast paralleelkatsest saadud andmete dispersiooni abil. Neid andmeid kasutatakse kaalutud keskmise P_{OW} väärtuse arvutamiseks üksikute paralleelkatsete tulemuste alusel. Selleks kasutatakse statistilise kaaluna paralleelkatsete tulemuste dispersiooni pöördväärtust. Suure hajuvusega (suure dispersiooniga) ja seega vähem usaldatavad andmed mõjutavad kaalutud keskmist tulemust vähem kui väiksema dispersiooniga andmed.
49. Samal viisil arvutatakse ka kaalutud standardhälve. See iseloomustab P_{OW} määramise korratavust. Kaalutud standardhälbe väike väärtus näitab, et P_{OW} määramise tulemus on ühes ja samas laboratooriumis hästi korratav. Järgnevalt on kirjeldatud katseandmete formaalstatistilist analüüsi.

▼ **M4****Tulemuste töötlemine***Tasakaalu saavutamise näitamine*

50. Iga proovivõtuhetke jaoks arvutatakse 1-oktanoolis ja vees määratud uuritava aine kontsentratsioonide suhte logaritm ($\log C_O/C_W$). Tasakaalu saavutamise näitamiseks ehitatakse graafik, mis kajastab selle suhte sõltuvust ajast. Kui vähemalt nelja proovi tulemused moodustavad graafikul platoo, tähendab see, et tasakaal on saavutatud ja uuritav aine on 1-oktanoolis tõesti lahustunud. Kui kõnesolevat platood ei ole, jätkatakse katset, kuni nelja järjestikuse proovi tulemused annavad tõusu, mis ei erine oluliselt 0-st usaldusnivool 0,05, näidates, et $\log C_O/C_W$ ei sõltu ajast.

Log P_{OW} arvutamine

51. Iga paralleelkatse log P_{OW} saamiseks arvutatakse kaalutud keskmine log C_O/C_W väärtus kõvera log C_O/C_W vs. aeg tasakaaluolekule vastaval osal. Kaalutud keskmise arvutamisel kaalutakse katseandmeid dispersiooni pöördväärtusega; selle tulemusena on katseandmete mõju lõpptulemusele pöördvõrdeline nende määramatusega.

Keskmine log P_{OW}

52. log P_{OW} keskvaartuse arvutamiseks eri paralleelkatsete keskvaartustest leitakse vastavate dispersioonidega kaalutud paralleelkatsete tulemuste keskmine.

Arvutused tehakse järgmiselt:

$$\log P_{OW,Av} = (\sum w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\sum w_i)^{-1}$$

kus

$\log P_{OW,i}$ = on paralleelkatses i leitud log P_{OW} väärtus,

$\log P_{OW,Av}$ = on üksikutes paralleelkatses määratud log P_{OW} väärtuste kaalutud keskmine,

w_i = on paralleelkatses i log P_{OW} väärtusele omistatud statistiline kaal.

Statistilise kaaluna w_i kasutatakse log $P_{OW,i}$ dispersiooni pöördväärtust ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. log P_{OW} keskvaartuse viga hinnatakse tasakaaluolekus üksikutes paralleelkatses määratud log C_O/C_W väärtuste korratavuse järgi. See väljendatakse log $P_{OW,Av}$ kaalutud standardhälvena ($\sigma_{\log P_{OW,Av}}$), mis omakorda on log $P_{OW,Av}$ väärtusega seotud vea mõõt. Kaalutud standardhälbe võib arvutada kaalutud dispersioonist ($\text{var}_{\log P_{OW,Av}}$) järgmisel viisil:

$$\text{var}_{\log P_{OW,Av}} = (\sum w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\sum w_i \times (n - 1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log P_{OW,Av}} = (\text{var}_{\log P_{OW,Av}})^{0,5}$$

n on paralleelkatsete arvu tähis.

▼ M4**Katseprotokoll**

54. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav aine:

- tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem (mis näitab määrgistuse asukohta, kui kasutatakse radioaktiivselt määrgistatud ainet) ja olulised füüsikalise-keemilised omadused (vt punkt 17);
- uuritava aine puhtusaste (lisandid);
- määrgistatud kemikaali määrgise puhtus ja molaarne aktiivsus (vajaduse korral);
- $\log P_{OW}$ esialgne hinnanguline väärtus ja selle tuletusviis.

Katsetingimused:

- uuringu kuupäevad;
- katsetemperatuur;
- 1-oktanooli ja vee maht katse alguses;
- võetud 1-oktanooli ja vee proovide maht;
- pärast proovide võtmist katsenõusse jäänud 1-oktanooli ja vee maht;
- katsenõu ja segamistingimuste kirjeldus (segamispulga ja katsenõu ehitus, keerise sügavus millimeetrites ja segamiskiirus, kui see on teada);
- uuritava aine määramiseks kasutatud analüüsimeetod ja selle meetodi mõõtmislävi;
- proovivõtuajad;
- vee faasi ja kasutatud puhvrite pH (kui ioniseeruvate molekulide tõttu reguleeriti pH väärtust);
- paralleelkatsete arv.

Tulemused:

- kasutatud analüüsimeetodi korratavus ja tundlikkus;
- 1-oktanoolis ja vees määratud uuritava aine kontsentratsioonide sõltuvus ajast;
- massibilansi kontroll;
- katsetemperatuur ja selle standardhälve või katsetemperatuuri vahemik;
- kontsentratsioonide suhte ja aja seost kajastav regressioonikõver;
- keskvaartus $\log P_{OW,Av}$ ja selle standardhälve;
- tulemuste arutelu ja tõlgendus;

▼ **M4**

- representatiivse analüüsi originaalarvandmete näidis (hea laboritava kohaselt säilitatakse kõik originaalandmed), kaasa arvatud asendavate standardainete saagised, kaliibrimisel kasutatud kontsentratsioonide arv (koos kaliibrimiskõvera korrelatsioonikordaja kriteeriumidega) ning kvaliteedi tagamise ja/või kontrolli tulemused;
- kui on olemas, siis: mõõtmismeetodi valideerimisaruanne (esitatakse kirjandusviitena).

KIRJANDUS

- 1) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the „slow-stirring” method. *Environ. Toxicol. Chem.* 8: 499–512.
- 2) Käesoleva lisa peatükk A.8. Jaotuskoefitsient.
- 3) Käesoleva lisa peatükk A.8. Jaotuskoefitsient.
- 4) OECD (2000). OECD Draft Guideline for the Testing of Chemicals: 122 Partition Coefficient (n-Octanol/Water): pH-Metric Method for Ionisable Substances. Paris.
- 5) Tolls J (2002). Partition Coefficient 1-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals, Validation Report. RIVM contract-Nrs 602730 M/602700/01.
- 6) Boethling RS, Mackay D (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.
- 7) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.
- 8) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2596–2602.
- 9) OECD (1981) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals: 112 Dissociation Constants in Water. Paris.
- 10) Käesoleva lisa peatükk A.6. Lahustuvus vees.
- 11) Käesoleva lisa peatükk C.7. Lagunemine – abiootiline lagunemine hüdrolüüsi teel sõltuvalt pH-st.
- 12) Käesoleva lisa peatükk C.4, II–VII osa (meetodid A–F). Kiire biolagunevuse määramine.
- 13) Käesoleva lisa peatükk A.4. Aururõhk.
- 14) Pinsuwan S, Li A and Yalkowsky S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, *J. Chem. Eng. Data.* 40: 623–626.
- 15) Lyman WJ (1990). Solubility in water. In: Handbook of Chemical Property Estimation Methods: Environmental Behavior of Organic Compounds, Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, Eds. American Chemical Society, Washington, DC, 2–1 to 2–52.
- 16) Leo A, Weininger D (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.
- 17) Meylan W (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.
- 18) Compudrug L (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.
- 19) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.

▼ M4

- 20) Lyman WJ (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, *Handbook of chemical property estimation*, American Chemical Society, Washington, D.C.
- 21) Rekker RF, de Kort HM (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1 000 data point set. *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 14: 479–488.
- 22) Jübermann O (1958). Houben-Weyl, ed, *Methoden der Organischen Chemie*: 386–390.

▼ **M4**

1. liide

Eri log P_{ow} väärtusega uuritavate ainete veefaasis määramiseks vajalike vee miinimumkoguste arvutamise tabel

Eeldused

- Ühe alikvoodi maksimaalne maht on 10 % üldmahust, 5 alikvooti on 50 % üldmahust.
- Uuritava aine kontsentratsioon on 70 % lahustuvusest kummaski faasis. Väiksema kontsentratsiooni puhul on vaja kasutada veel suuremat mahtu.
- Avastamisläve juures määramiseks vajalik maht on 100 ml.
- Uuritavatel ainetel on mõistlikud log P_{ow} vs. log S_w ja log P_{ow} vs. SR (S_{oct}/S_w) sõltuvused.

S_w hindamine

log P _{ow}	Võrrand	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

S_{oct} hindamine

log P _{ow}	Võrrand	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

Uuritava aine üldmass (mg)	Mass _{oct} /Mass _{H2O}	Mass _{H2O} (mg)	Konts _{H2O} (mg/l)	Mass _{oct} (mg)	Konts _{oct} (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

*Mahtude arvutamine***Veefaasi väikseim vajalik maht avastamisläve eri väärtuste korral**

log K _{ow}	Avastamislävi (mikrogramm/l)	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4		0,04	0,38	3,80	38	380
4,5		0,09	0,94	9,38	94	938
5		0,23	2,32	23,18	232	2 318
5,5		0,57	5,73	57,26	573	5 726
6		1,41	14,15	141	1 415	14 146
6,5		3,50	34,95	350	3 495	34 950
7		8,64	86,35	864	8 635	86 351
7,5		21,33	213	2 133	21 335	213 346
8		52,71	527	5 271	52 711	527 111
Avastamisläve juures määramiseks vajalik maht (l)	0,1					

Selgitused arvutuste kohta

Vastab vähem kui 10 protsendile veefaasi üldmahust, 1-liitrine katsenõu tasakaalustamiseks.

Vastab vähem kui 10 protsendile veefaasi üldmahust, 2-liitrine katsenõu tasakaalustamiseks.

Vastab vähem kui 10 protsendile veefaasi üldmahust, 5-liitrine katsenõu tasakaalustamiseks.

Vastab vähem kui 10 protsendile veefaasi üldmahust, 10-liitrine katsenõu tasakaalustamiseks.

Ületab 10 % isegi 10-liitrise katsenõu mahust.

▼M4

Vajaliku mahu sõltuvus lahustuvusest vees ja log P_{OW} väärtusest

Veefaasi väiksem vajalik maht avastamisläve eri väärtuste korral (ml)

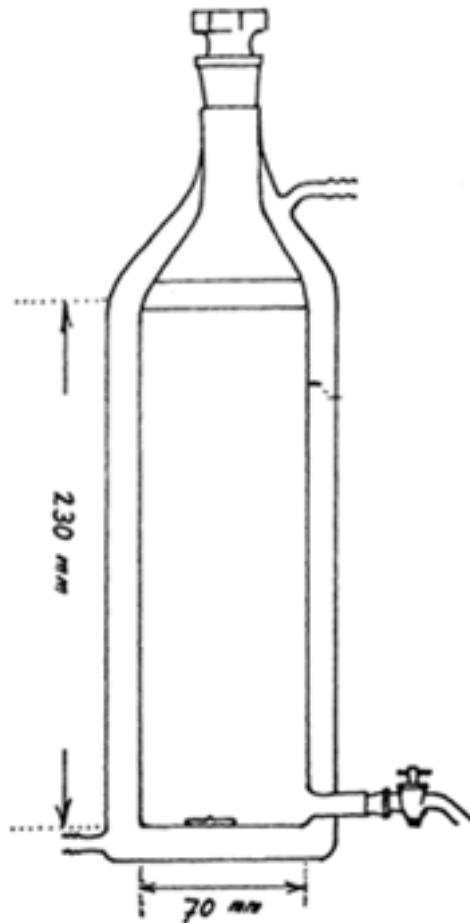
log P _{ow}	S _w (mg/l)	Avastamislävi (mikrogramm/l) →	0,001	0,01	0,10	1,00	10
4	10		0,01	0,12	1,19	11,90	118,99
	5		0,02	0,24	2,38	23,80	237,97
	3		0,04	0,40	3,97	39,66	396,62
	1		0,12	1,19	11,90	118,99	1 189,86
4,5	5		0,02	0,20	2,03	20,34	203,37
	2		0,05	0,51	5,08	50,84	508,42
	1		0,10	1,02	10,17	101,68	1 016,83
	0,5		0,20	2,03	20,34	203,37	2 033,67
5	1		0,09	0,87	8,69	86,90	869,01
	0,5		0,17	1,74	17,38	173,80	1 738,02
	0,375		0,23	2,32	23,18	231,75	2 317,53
	0,2		0,43	4,35	43,45	434,51	4 345,05
5,5	0,4		0,19	1,86	18,57	185,68	1 856,79
	0,2		0,37	3,71	37,14	371,36	3 713,59
	0,1		0,74	7,43	74,27	742,72	7 427,17
	0,05		1,49	14,85	148,54	1 485,43	14 854,35
6	0,1		0,63	6,35	63,48	634,80	6 347,95
	0,05		1,27	12,70	126,96	1 269,59	12 695,91
	0,025		2,54	25,39	253,92	2 539,18	25 391,82
	0,0125		5,08	50,78	507,84	5 078,36	50 783,64
6,5	0,025		2,17	21,70	217,02	2 170,25	21 702,46
	0,0125		4,34	43,40	434,05	4 340,49	43 404,93
	0,006		9,04	90,43	904,27	9 042,69	90 426,93
	0,003		18,09	180,85	1 808,54	18 085,39	180 853,86
7	0,006		7,73	77,29	772,89	7 728,85	77 288,50
	0,003		15,46	154,58	1 545,77	15 457,70	154 577,01
	0,0015		23,19	231,87	2 318,66	23 186,55	231 865,51
	0,001		46,37	463,73	4 637,31	46 373,10	463 731,03
7,5	0,002		19,82	198,18	1 981,77	19 817,73	198 177,33
	0,001		39,64	396,35	3 963,55	39 635,47	396 354,66
	0,0005		79,27	792,71	7 927,09	79 270,93	792 709,32

▼ **M4**

$\log P_{ow}$	S_w (mg/l)	Avastamislävi (mikrogramm/l) →	0,001	0,01	0,10	1,00	10
	0,00025		158,54	1 585,42	15 854,19	158 541,86	1 585 418,63
8	0,001		33,88	338,77	3 387,68	33 876,77	338 767,72
	0,0005		67,75	677,54	6 775,35	67 753,54	677 535,44
	0,00025		135,51	1 355,07	13 550,71	135 507,09	1 355 070,89
	0,000125		271,01	2 710,14	27 101,42	271 014,18	2 710 141,77
Avastamisläve juures määramiseks vajalik maht (l) on		0,1					

2. liide

Klaasist veesärgiga katsenõu P_{ow} määramiseks aeglase segamise katse abil



▼B**B OSA: MÜRGISUSE JA MUUDE TERVISEMÕJUDE MÄÄRAMISE MEETODID**

SISUKORD

ÜLDINE SISSEJUHATUS

- B.1a. ÄGE SUUKAUDNE MÜRGISUS – KINDLA ANNUSE PROTSEDUUR
- B.1b. ÄGE SUUKAUDNE MÜRGISUS – ÄGEDA MÜRGISU-SASTME MEETOD
- B.2. ÄGE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL
- B.3. ÄGE MÜRGISUS (NAHAKAUDNE)
- B.4. ÄGE MÜRGISUS: NAHAÄRRITUS/-SÖÖVITUS
- B.5. ÄGE MÜRGISUS: SILMADE ÄRRITUS/SÖÖVITUS
- B.6. NAHA SENSIBILISEERIMINE
- B.7. SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 28-PÄEVANE UURING NÄRILISTEL
- B.8. SUBAKUUTNE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL: 28-PÄEVANE UURING
- B.9. KORDUSDOOSI MÜRGISUS (28 PÄEVA, NAHAKAUDNE)
- B.10. MUTAGEENSUS – IMETAJATE KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE *IN VITRO*
- B.11. MUTAGEENSUS – KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE IMETAJATE LUUÜDIS *IN VIVO*
- B.12. MUTAGEENSUS – PISITUUMA KATSE IMETAJATE ERÜTROTSÜÜTIDES *IN VIVO*
- B.13/14. MUTAGEENSUS – BAKTERITE PÕÖRDMUTATSIOONKATSE
- B.15. MUTAGEENSUSE JA KARTSINOGEENSUSE UURING, GEENMUTATSIOON – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
- B.16. MITOOTILINE REKOMBINATSIOON – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
- B.17. MUTAGEENSUS – *IN VITRO* IMETAJATE RAKKUDE GEENMUTATSIOONKATSE
- B.18. DNA KAHJUSTAMINE JA PARANDAMINE – PLAANIVÄLINE DNA SÜNTEES – IMETAJATE RAKKUEL *IN VITRO*
- B.19. ÕDEKROMATIIDI VAHETUSE *IN VITRO* ANALÜÜS
- B.20. SUGULIITELISE RETSESSIIVSE LETAALSUSE TEST ÄÄDIKAKÄRBSEL *DROSOPHILA MELANOGASTER*

▼B

- B.21. IMETAJARAKU TRANSFORMATSIOONITESTID *IN VITRO*
- B.22. NÄRILISTE DOMINANTSE LETAALSUSE TEST
- B.23. IMETAJATE SPERMATOGOONIDE KROMOSOOMABER-
RATSIOONKATSE
- B.24. HIIRE NAHALAIKUDE TEST
- B.25. HIIRE PÄRILIK TRANSLOKATSIOON
- B.26. SUBKROONILISE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE –
SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 90PÄEVANE
UURING NÄRILISTEL
- B.27. SUBKROONILISE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE –
SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 90PÄEVANE
UURING MITTENÄRILISTEL
- B.28. SUBKROONILISE TOKSILISUSE TEST NAHAKAUDSEL
MANUSTAMISEL 90PÄEVANE KORDUVANNUSTE NAHA-
KAUDSE MANUSTAMISE UURING NÄRILISTE LIIKIDEL
- B.29. SUBKROONILINE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL: 90-
PÄEVANE UURING
- B.30. KROONILISE MÜRGISUSE UURINGUD
- B.31. SÜNNIEELSE ARENGU MÜRGISUSE UURIMUS
- B.32. KANTSEROGEENSUSE UURINGUD
- B.33. KOMBINEERITUD KROONILISE TOKSILISUSE – KANTSE-
ROGEENSUSE UURING
- B.34. ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONITOKSILISUSE
UURING
- B.35. KAHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONI TOKSILISUSE
UURING
- B.36. TOKSIKOKINEETIKA
- B.37. FOSFORORGAANILISTEST AINETEST PÕHJUSTATUD
VIIVISTOIMEGA NEUROTOKSILISUS PÄRAST ÄGEDAT
KOKKUPUUTUMIST
- B.38. FOSFORORGAANILISTEST AINETEST PÕHJUSTATUD
VIIVISTOIMEGA NEUROTOKSILISUSE 28PÄEVANE
KORDUSDOOSI UURING
- B.39. PLAANIVÄLISE DNA SÜNTEESI (UDS) KATSE IMETAJATE
MAKSARAKKUDEGA *IN VIVO*
- B.40. NAHASÖÖVITUSKATSE *IN VITRO*: TRANSKUTAANSE
ELEKTRITAKISTUSE (TER) MÕÕTMINE
- B.40a. NAHASÖÖVITUS *IN VITRO*: KATSE INIMNAHA MUDELIGA

▼ B

- B.41. *IN VITRO* 3T3 NRU FOTOTOKSILISUSE KATSE
- B.42. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÖLMEDE KATSE
- B.43. NEUROTOKSILISUSE UURING NÄRILISTEL
- B.44. NAHAKAUDNE IMENDUMINE: *IN VIVO* MEETOD
- B.45. NAHAKAUDNE IMENDUMINE: *IN VITRO* MEETOD
- B.46. *IN VITRO* NAHAÄRRITUSKATSE: REKONSTRUEERITUD INIMEPIDERMISE MUDELI KATSEMEETOD

- B.47. VEISE SARVKESTA HÄGUSUSE JA LÄBILASKVUSE KATSEMEETOD SILMA SÖÖVITAVATE JA TUGEVASTI ÄRRITAVATE AINETE KINDLAKSTEGEMISEKS
- B.48. ISOLEERITUD KANASILMA MEETOD SILMA SÖÖVITAVATE JA TUGEVALT ÄRRITAVATE AINETE KINDLAKSTEGEMISEKS
- B.49. *IN VITRO* IMETAJARAKKUDE MIKROTUUMA KATSE
- B.50. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÖLMEDE KATSE: DA
- B.51. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÖLMEDE KATSE: BRDU-ELISA

▼ M4

- B.52. ÄGE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL – ÄGEDA MÜRGISUSE KLASSI MÄÄRAMISE MEETOD

▼ M5

- B.53. ARENGUHÄIREID PÕHJUSTAVA NEUROTOKSILISUSE UURING
- B.54. UTEROTROOFNE BIOKATSE NÄRILISTEL: KIIRE SÕELKATSE ÖSTROGEENSETE OMADUSTE VÄLJASELGITAMISEKS
- B.55. HERSHBERGERI BIOKATSE ROTTIDEL: KIIRE SÕELKATSE (ANTI)ANDROGEENSETE OMADUSTE VÄLJASELGITAMISEKS
- B.56. LAIENDATUD ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTIIVTOKSILISUSE UURING
- B.57. H295R STEROIDOGENEESI KATSE
- B.58. TRANSGEENSE NÄRILISE SOMAATILISTE JA SUGURAKKUDE GEENIDE MUTATSIOONI KATSE

▼B**ÜLDINE SISSEJUHATUS****A. UURITAVA AINE ISELOOMUSTUS**

Uuritava aine koostis, sealhulgas peamised lisandid ja selle vastavad füüsikalised-keemilised omadused (sealhulgas stabiilsus), peaksid olema teada enne toksilisuse uuringu alustamist.

Uuritava aine füüsikalised-keemilised omadused annavad olulist teavet manustamisviisi valimise, iga konkreetse uuringu kavandamise ning uuritava aine käitlemise ja säilitamise jaoks.

Doseeritavas aines ja bioloogilises materjalis oleva uuritava aine (sealhulgas võimaluse korral peamiste lisandite) kindlakstegemiseks kasutatav kvalitatiivne ja kvantitatiivne analüüsimeetod tuleks välja töötada enne uuringu alustamist.

Katsearuanne peaks hõlmama kogu teavet uuritava aine identifitseerimise, selle füüsikalised-keemilised omaduste, selle puhtuse ja käitumise kohta.

B. LOOMADE HOOLDAMINE

Toksilisuse uurimisel on oluline keskkonnatingimuste range kontroll ja õiged loomade hooldamise viisid.

i) *Pidamistingimused*

Katsealuste loomade ruumide või piirdeaedade keskkonnatingimused peaksid olema katseliikide jaoks sobivad. Rottide, hiirte ja merisigade puhul on sobiv toatemperatuur 22 ± 3 °C ning suhteline õhuniiskus peaks olema 30–70 %; küülikute puhul peaks temperatuur olema 20 ± 3 °C ning suhteline õhuniiskus 30–70 %.

Mõned uurimismeetodid on temperatuuri suhtes eriti tundlikud ning sellistel puhkudel on sobivate temperatuuritingimuste üksikasjad lisatud uurimismeetodi kirjeldusse. Kõikide toksilise toime uuringute puhul tuleks jälgida temperatuuri ja niiskust, samuti tuleks need andmed registreerida ning uuringu lõpparuandesse lisada.

Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valget ja 12 tundi pimedat aega. Valgustustsükli üksikasjad tuleks registreerida ja märkida uuringu lõpparuandesse.

Kui meetodis ei ole teisiti sätestatud, võib loomi pidada üksikult või väikeste rühmadena, kus emas- ja isasloomad on eraldi; kui puuris on mitu looma, ei tohiks koos olla rohkem kui viis looma.

Loomkatsete aruannetes on oluline ära märkida, millist tüüpi puure kasutati ning mitu looma igas puuris nii keemilise ainega kokkupuutumise kui ka järgneva vaatlusperioodi jooksul oli.

▼Bii) *Söötistingimused*

Toiduvalik peaks vastama kõikidele katses kasutatava liigi toitainevajadustele. Kui uuritavat ainet manustatakse loomadele toidu kaudu, võib toidu toiteväärtust vähendada vastava uuritava aine ja toidukomponendi võrra. Sellise reaktsiooni võimalikkust tuleks katse tulemuste tõlgendamisel arvesse võtta. Kasutada võib ka tavapärasest katseloomadele mõeldud toitu ning joogivee hulk peab olema piiramatut. Toidu valikut võib mõjutada vajadus tagada sobiv segu, mis võimaldab uuritava aine manustamist koos toiduga.

Toksilisust mõjutavaid toidu saasteaineid ei tohiks olla sellises kontsentratsioonis, et see segaks katse tegemist.

C. **ALTERNATIIVSED KATSED**

Euroopa Liit püüab edendada alternatiivmeetodite väljatöötamist ja kinnitamist, mis annaksid loomkatsetest saadud teabega tasemelt samaväärset teavet, kuid kus kasutatakse vähem loomi ja mis põhjustaksid vähem kannatusi või milles välditakse üldse loomade kasutamist.

Selliste meetodite olemasolu korral tuleb neid kasutada igal võimalusel ohu kirjeldamisel ja seejärel loomuomase ohtlikkuse liigitamisel ja märgistamisel.

D. **HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE**

Katsete hindamisel ja tõlgendamisel tuleb arvesse võtta seda, millisel määral on loomkatsete ja *in vitro* uuringute tulemusi võimalik ekstrapoleerida vahetult inimesele, ning seetõttu võib võimaluse korral kasutada katse tulemuste kinnitamiseks tõendeid kahjulikust toimest inimese tervisele.

E. **VIITED KIRJANDUSELE**

Enamik nendest meetoditest on töötatud välja OECD programmi „Testing Guidelines” raames ning neid tuleks kasutada kooskõlas heade laboritavadega, et tagada võimalikult laialdane „andmete vastastikune heakskiitmine”.

Lisateavet võib leida OECD suunistes olevatest viidetest ja muust asjakohasest kirjandusest.

▼B**B.1a. ÄGE SUUKAUDNE MÜRGISUS – KINDLA ANNUSE PROTSEDUUR****1. MEETOD**

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD TG 420ga (2001).

1.1. SISSEJUHATUS

Traditsioonilised ägeda mürgisuse hindamise meetodid kasutavad loomade surma lõpetamiskriteeriumina. 1984. aastal soovitas British Toxicology Society uut lähenemist ägeda mürgisuse katsetamisele, mis põhineb aine manustamisel kindla annusemääraga seeriana (1). See lähenemine vältis loomade surma kasutamist lõpetamiskriteeriumina ja tugines selle asemel selgete mürgisuse nähtude vaatlemisele ühel seeriast valitud kindlal annusemääral. Protseduur kiideti katsemeetodina heaks 1992. aastal Ühendkuningriigi (2) ja rahvusvaheliste (3) *in vivo* valideerimiste põhjal. Seejärel hinnati kindla annuse protseduuri statistilisi omadusi matemaatiliste mudelite abil mitmetes uuringutes (4, 5, 6). *In vivo* ja mudeluuringud on tõestanud, et protseduur on korratav, et selles kasutatakse vähe loomi ja et see põhjustab vähem kannatusi kui traditsioonilised meetodid ning et selle abil saab klassifitseerida ained nii nagu muude ägeda mürgisuse katsemeetoditega.

Juhised antud eesmärgi saavutamiseks kõige sobivama katsemeetodi valimiseks võib leida ägeda suukaudse mürgisuse katsete juhisdokumentid („Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing” (7)). Nimetatud juhisdokument sisaldab samuti lisateavet katsemeetodi B.1a kasutamise ja tõlgendamise kohta.

Meetodi põhimõte on, et põhiuuringus kasutatakse üksnes mõõdukalt mürgiseid annuseid ja et tõenäoliselt surmavate annuste manustamist tuleks vältida. Samuti ei tohiks manustada annuseid, mis teatavasti põhjustavad märkimisväärset valu või kannatusi sööbivate või tõsiselt ärritavate mõjude tõttu. Suremas loomad või loomad, kes ilmselt on valus või kellel on tugeva ja kestva kannatuse tunnused, surmatakse humaanselt ning need võetakse arvesse katsetulemuste tõlgendamisel samamoodi nagu loomi, kes surid katse käigus. Eraldi juhisdokumentis (8) on esitatud kriteeriumid, mille põhjal tehakse otsus suremas või raskelt kannatavate loomade surmamiseks, ja juhised prognoositava või ähvardava surma kindlakstegemiseks.

Meetod annab teavet ohtlike omaduste kohta ning võimaldab reastada ja klassifitseerida ainet ägedat mürgisust põhjustavate kemikaalide klassifitseerimiseks vastavalt globaalselt harmoneeritud süsteemile (Globally Harmonised System – GHS (9)).

Katselaboratoorium võtab arvesse kogu katseaine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave sisaldab aine nimetust ja keemilist struktuuri, selle füüsikalise-keemilise omadusi, muude ainega *in vitro* või *in vivo* tehtud mürgisuskatsete tulemusi, struktuurilt samalaadsete ainete toksikoloogilisi andmeid ja aine eeldatavat otstarvet. Selline teave on vajalik kõikide asjaosaliste veenmiseks, et katse on tähtis inimeste tervise kaitsmiseks, ja aitab valida sobivat lähteannust.

▼B

1.2. MÕISTED

Äge suukaudne mürgisus – viitab sellistele kahjulikele mõjudele, mis ilmnevad pärast aine suukaudselt manustamist ühekordse annuse või seeriaviisiliste annustena 24 tunni jooksul.

Edasilükkunud surm – loom ei sure ega näi olevat suremas 48 tunni jooksul, kuid sureb hiljem, 14päevase jälgimisperioodi jooksul.

Annus – manustatava katseaine kogus. Annust väljendatakse katseaine massina katselooma massiühiku kohta (nt mg/kg).

Ilmne mürgisus – üldine mõiste, mis kirjeldab katseaine manustamise järel ilmnenuid selgeid mürgisuse tunnuseid (vt näiteid viitest 3). Suuruselt järgmine kindel annus võib põhjustada enamikul loomadest tõenäoliselt kas tugevat valu ja kestva tugeva kannatuse tunnuseid, surmaeelset seisundit (kriteeriumid on toodud humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (8)) või tõenäoliselt surma.

GHS – Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures (keemiliste ainete ja segude globaalselt harmoneeritud klassifitseerimissüsteem). Ühistegevus, milles osalevad OECD (inimeste tervis ja keskkond), ohtlike ainete vedu käsitlev ÜRO eksperdikomitee (füüsikalise-keemilised omadused) ja ILO (ohtudest teavitamine) ning mida koordineerib kemikaalide mõistlikku haldamist käsitlev organisatsioonidevaheline programm (IOMC).

Ähvardav surm – loom on suremas või sureb tõenäoliselt enne järgmist kavandatud jälgimisperioodi. Näriistel võiksid sellisele seisundile viitavateks märkideks olla krambid, külili magamine, loidus ja värin (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (8)).

LD₅₀ (surmava annuse mediaan) – aine statistiliselt määratletud ühekordne annus, mis tõenäoliselt põhjustab suukaudsel manustamisel surma 50 %-l loomadest. LD₅₀ väärtust väljendatakse katseaine massina katselooma massiühiku kohta (mg/kg).

Piirannus – vastab katses kasutatavale maksimaalsele annusele (2 000 või 5 000 mg/kg).

Surmaeelne seisund – loomad, kes on suremas või kes ei suuda ellu jääda ravist hoolimata (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (8)).

Ennustatav surm – selliste kliiniliste tunnuste olemasolu, mis viitavad sellele, et surm saabub teatud aja möödumisel enne katse kavandatavat lõppu, näiteks suutmatus tarbida vett või toitu (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (8)).

▼B

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Ühesooliste loomade rühmadele annustatakse katseainet järk-järgult 5, 50, 300 ja 2 000 mg/kg kindlate annustena (erandkorras võidakse kasutada 5 000 mg/kg kindlat lisaannust, vt punkti 1.6.2). Esialgne annusemäär valitakse eelkatse põhjal annusena, mis eeldatavasti põhjustab mõningaid mürgisuse nähte, kuid ei põhjusta tõsiseid toksilisi mõjusid või suremust. Valu, kannatuse ja ähvardava surmaga seotud kliinilisi tunnuseid ja tingimusi kirjeldatakse üksikasjalikult OECD juhisdokumendis (8). Järgnevatele loomarühmadele võib annustada kaitseaine suuremaid või väiksemaid kindlaid annuseid sõltuvalt sellest, kas neil on olemas või puuduvad märgid mürgisuse või suremuse kohta. Käesolevat protseduuri jätkatakse seni, kuni on kindlaks tehtud tõenäoliselt mürgisust põhjustav annus või surmajuhtum, või kui suurim annus ei avalda mõju või kui väikseim annus põhjustab surma.

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. Loomaliikide valik

Eelistatud näriliste liik on rotid, kuigi võib kasutada ka näriliste teisi liike. Tavaliselt kasutatakse emasloomi (7). Selle põhjuseks on, et tavapäraseid LD₅₀ katseid käsitlevad kirjandusülevaated näitavad, et sugupoolte tundlikkuses on vähe erinevusi, kuid neil juhtudel, kui erinevusi on täheldatud, on emasloomad üldiselt veidi tundlikumad (10). Kui struktuurselt samalaadsete kemikaalide toksikoloogilisi või toksikokineetilisi omadusi käsitlevatest andmetest nähtub, et isasloomad on tõenäoliselt tundlikumad, siis kasutatakse neid. Kui katse sooritatakse isasloomadega, tuleks esitada piisav põhjendus.

Kasutatakse noorte tervete täiskasvanud loomade enim kasutatavaid laboritüvesid. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Iga loom peaks annustamise alustamisel olema 8–12 nädalat vana ning tema mass ei tohiks erineda rohkem kui ± 20 % varem annuse saanud loomade keskmisest massist.

1.4.2. Loomade pidamise ja toitmise tingimused

Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal, peaks eesmärk olema hoida seda vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Toitmisel võib kasutada tavapärast labori toiduvalikut koos piiramatul hulgal joogiveega. Loomad võib grupeerida puuridesse annuse põhjal, kuid puuris olevate loomade arv ei tohiks takistada iga looma selget jälgimist.

1.4.3. Loomade ettevalmistamine

Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks ning hoitakse oma puurides vähemalt 5 päeva enne annustamise alustamist, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega.

▼B1.4.4. **Annuste valmistamine**

Üldiselt manustatakse katseaineid kasutatavate annuste vahemikus konstantses mahus nii, et muutub annustatava valmistise kontsentratsioon. Kui uuritakse vedelat lõppsaadust või segu, võib lahjendamata katseaine kasutamine, s.t konstantse kontsentratsiooni juures, olla siiski olulisem nimetatud aine hilisemal riskianalüüsil. See on mõnede reguleerivate asutuste nõue. Kummalgi juhul ei tohi manustamisel ületada annuse suurimat mahtu. Vedeliku suurim ühekordselt manustatav maht sõltub katselooma suurusest. Näriliste puhul ei tohiks maht tavaliselt ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta; vesilahuste puhul võib siiski manustada 2 ml 100 g kehamassi kohta. Annuste valmistise koostamiseks on soovitatav võimaluse korral kasutada vesilahust/suspensiooni/emulsiooni, tähtsuse järjekorras oleks järjestus lahus/suspensioon/emulsioon õlis (nt maisiõli) ja seejärel muudel kandeainetel põhinev lahus. Veest erinevate kandeainete puhul peaks kandeaine toksikoloogilised omadused olema teada. Annused tuleb valmistada ette natuke aega enne manustamist, välja arvatud juhul, kui valmistise stabiilsus sellel ajavahemikul, mil seda kasutatakse, on teada ja näib aktsepteeritav.

1.5. **PROTSEDUUR**1.5.1. **Annuste manustamine**

Katseainet manustatakse ühekordse annusena söögitoru kaudu või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Erandkorras, kui ühekordne annus ei ole võimalik, võib annust manustada väiksemates osades kuni 24 tunni jooksul.

Loomad peaksid enne doosi manustamist paastuma (nt rotte hoitakse söömata terve öö ja hiiri 3–4 tundi, üksnes vesi on saadaval). Paastumise järel loomi kaalutakse ja manustatakse katseaine. Pärast aine manustamist võib hoida rotte söömata veel 3–4 tundi ja hiiri 1–2 tundi. Kui annust manustatakse osadena teatud ajavahemiku jooksul, võib sõltuvalt ajavahemiku pikkusest osutada vajalikuks anda loomadele toitu ja vett.

1.5.2. **Eelkatse**

Eelkatse eesmärk on võimaldada valida põhiuuringu tarbeks sobiv lähteannus. Katseainet manustatakse üksikutele loomadele järkjärgult lisas 1 toodud vooskeemide kohaselt. Eelkatse on lõpetatud siis, kui saab langetada otsuse põhikatse lähteannuse kohta (või kui tuvastatakse surm madalaima kindla annuse puhul).

Eelkatse lähteannus valitakse kindlate annusmäärade 5, 50, 300 ja 2 000 mg/kg hulgast annusena, mis eeldatavasti põhjustab ilmset mürgisust, mis võimaluse korral põhineb sama kemikaali või struktuurselt sarnaste kemikaalidega sooritatud *in vivo* ja *in vitro* katsete andmetel. Sellise teabe puudumise korral on lähteannuseks 300 mg/kg.

Iga looma korral on manustamiste vahel vähemalt 24tunnine vahemik. Kõiki loomi jälgitakse vähemalt 14 päeva.

▼B

Maksimaalselt kindla annuse määra 5 000 mg/kg võidakse kasutada erandkorras või siis, kui see on põhjendatud konkreetsete normatiivsete vajadustega (vt 3. lisa). Loomade heaolu pärast ei ole soovitud loomkatsete tegemisel GHS 5. kategooria (2 000–5 000 mg/kg) annus ja seda tuleks kasutada üksnes siis, kui on eriti tõenäoline, et sellise katse tulemustel on otsene tähtsus inimeste ja loomade tervise või keskkonna kaitsmiseks.

Juhul kui loom, kelle peal katsetati madalaimat kindla annuse määra (5 mg/kg), eelkatse käigus sureb, on tavapäraseks toimeguks uuringu peatamine ja aine klassifitseerimine GHS 1. kategooriasse (nagu on näidatud 1. lisas). Kui on siiski nõutav klassifitseerimise täiendav kinnitamine, võib teha järgmise valikulise lisaprotseduuri. Teisele loomale manustatakse annus 5 mg/kg. Kui teine loom sureb, siis kinnitab see GHS 1. kategooriat ja katse lõpetatakse kohe. Kui teine loom jääb ellu, siis manustatakse maksimaalselt kolmele täiendavale loomale annus 5 mg/kg. Kuna suurem risk on suur, tuleb ainet manustada kõnealustele loomadele üksikshaaval, et tagada nende heaolu. Ajavahemik igale loomale annuse manustamise vahel peab olema piisav selleks, et eelmine loom jääks tõenäoliselt ellu. Kui teine loom sureb, lõpetatakse viivitamata annustamine ja rohkematele loomadele doose ei manustata. Kuna teise surma juhtum (olenemata uuritud loomade arvust katse lõpetamise hetkel) kuulub tulemuse kategooriasse A (kaks või enam surma), järgitakse 5 mg/kg fikseeritud annuse puhul 2. lisas toodud klassifitseerimisreeglit (1. kategooria, kui on kaks või enam surmajuhtumit, või 2. kategooria, kui on vaid üks surmajuhtum). Lisaks sellele antakse 4. lisas juhiseid EL süsteemi kohase klassifitseerimise kohta enne uue GHSi kasutuselevõttu.

1.5.3. Põhiuuring

1.5.3.1. Loomade arv ja annusemäärad

Lähteannuse tasemel katsete tegemise järel võetavad meetmed on esitatud 2. lisas toodud vooskeemides. Üks kolmest meetmest on nõutav; kas katse peatamine või sobiva ohuklassi määramine, katse sooritamine suurema kindla annusega või väiksema kindla annusega. Loomade kaitsmiseks ei kasutata põhiuuringus uuesti eelkatses surma põhjustanud annusemäära (vt 2. lisa). Kogemused on näidanud, et kõige tõenäolisem tulemus lähteannuse tasemel on see, et ainet on võimalik klassifitseerida ja täiendavaid katseid ei ole vaja teha.

Igal uuritava annusemäära korral kasutatakse tavaliselt kokku viit ühest soost looma. Nende viie looma hulka kuulub üks loom eelkatses, kellele manustati valitud annusemäärale vastav annus, ja veel neli looma (v.a harvaesineval juhul, kui põhiuuringus kasutatav annusemäär ei sisaldunud eelkatses).

Annustamistevaheline ajavahemik iga annusemäära korral määratakse kindlaks mürgisuse tunnuste ilmnemise, kestuse ja ägeduse järgi. Järgmise annuse manustamist tuleb edasi lükata, kuni juba doosi saanud loomade ellujäämine on kindel. Vajaduse korral soovitatakse annustamistevaheliseks ajaks jätta iga annusemäära puhul 3 või 4 päeva, et võimaldada jälgida viivitud mürgisust. Ajavahemikku võib vajaduse korral korrigeerida, nt ebaselge vastuse puhul.

▼B

Kui kasutatakse kõrgeimat kindlat annust 5 000 mg/kg, tuleks järgida 3. lisas esitatud protseduuri (vt ka punkti 1.6.2).

1.5.3.2. *Piirisalduskatse*

Piirkatset kasutatakse peamiselt olukordades, kus katse tegijal on teavet selle kohta, et katsematerjal ei ole tõenäoliselt mürgine, s.t selle mürgisus ületab üksnes normatiivseid piirannuseid. Teavet katsematerjali mürgisuse kohta võib saada samalaadseid uuritud ühendeid või segusid või tooteid käsitlevatest teadmistest, võttes arvesse toksikoloogilisel oluliste koostisosade olemust ja protsendimäära. Sellistel juhtudel, kui on vähe teavet mürgisuse kohta või see puudub üldse või mil katsematerjal on eeldatavasti mürgine, tuleks sooritada põhikatse.

Käesoleva juhise kohase piirkatsena võidakse tavalist protseduuri kasutades kasutada eelkatset, mille lähteannus on 2 000 mg/kg (või erandkorras 5 000 mg/kg), mille järel manustatakse veel neljale loomale sama annus.

1.6. VAATLUSED

Loomi jälgitakse individuaalselt pärast annustamist vähemalt esimese 30 minuti jooksul, perioodiliselt esimese 24 tunni jooksul, erilist tähelepanu pööratakse esimese 4 tunni jooksul ja seejärel iga päev, kokku 14 päeva jooksul, välja arvatud juhul, kui loomad tuleb kõrvaldada uuringust ja surmata humaanselt nende heaolu pärast või kui loomad leitakse surnuna. Vaatluse kestust ei tuleks siiski järgalt määratleda. See tuleks kindlaks määrata toksiliste reaktsioonide, nende algushetke ja taastusperioodi pikkuse põhjal ja seda võib seega vajaduse korral pikendada. Mürgisuse nähtude ilmumise ja kadumise aeg on tähtis, eriti siis, kui on tendents, et mürgisusnähtud võivad ilmneda hilistumisega (11). Kõik vaatlused registreeritakse süstemaatiliselt, säilitades iga looma kohta eraldi andmed.

Täiendavad vaatlused on vajalikud siis, kui loomadel on jätkuvalt mürgisuse tunnused. Vaatlused peaksid hõlmama muutusi nahal ja karvkattes, silmades ja limaskestades ning samuti muutusi hingamissüsteemis, vereringes, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses tegevuses ja käitumises. Tähelepanu peaks olema suunatud värinate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma jälgimisele. Arvesse tuleks võtta humaansete lõpetamiskriteeriumide juhisdokumendis esitatud põhimõtteid ja kriteeriume (8). Suremas olevad loomad või loomad, kellel on tugev valu või tugeva kannatuse kestvad tunnused, tuleks surmata humaanselt. Kui loomad surmatakse humaansel viisil või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.

1.6.1. **Kehamass**

Iga looma mass tuleks määrata kindlaks veidi enne katseaine manustamist ja seejärel vähemalt kord nädalas. Massi muutused tuleks arvutada ja protokollida. Katse lõpus ellujäänud loomad kaalutakse ja siis surmatakse humaanselt.

▼B1.6.2. **Patoloogia**

Kõik katseloomad (kaasa arvatud need, kes surid katse käigus või kõrvaldatakse uuringust loomade heaolu tagamiseks) lahatakse. Kõik üldpatoloogilised muutused tuleks iga looma puhul protokollida. Esialgse annustamise järel 24 või enam tundi elus püsinud loomade üldpatoloogiliste muutustega organeid võidakse samuti uurida mikroskoopiliselt, kuna see võib anda kasulikku teavet.

2. **ANDMED**

Tulemused esitatakse iga üksiku looma kohta. Lisaks sellele tuleb kõik andmed esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates ära iga katserühma puhul osalevate loomade arvu, mürgisusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahangu tehtud leiud.

3. **ARUANDLUS**3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne peab sisaldama vastavalt vajadusele järgmist teavet.

Katseaine:

- füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalised-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerimine);
- identifitseerimiseks vajalikud andmed, kaasa arvatud CASi number.

Kandeaine (vajaduse korral):

- kandeaine valiku põhjendus, kui see on veest erinev.

Katseloomad:

- kasutatud liigid/tüved;
- loomade mikrobioloogiline seisund, kui see on teada;
- loomade arv, vanus ja sugu (sh vajaduse korral põhjendus isasloomade kasutamise kohta emasloomade asemel);
- päritolu, pidamistingimused, toitumine jne.

Katsetingimused:

- katseaine valmistamise üksikasjalikud andmed, sh üksikasjalikud andmed manustatava aine füüsilise oleku kohta;
- katseaine manustamise üksikasjad, sh annuste mahud ja annustamise aeg;
- üksikasjalikud andmed toidu ja vee kvaliteedi kohta (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);
- põhjendus lähteannuse valikuks.

▼B

Tulemused:

- tabelid iga looma (st loomad, kellel on mürgistustunnused, kaasa arvatud suremus, mõjude laad, ägedus ja kestus) reageerimise andmete ja annusemäärade kohta;
- tabelid kehamassi ja kehamassi muutuste kohta;
- iga looma mass annustamispäeval, seejärel nädalaste intervallidega ja surma- või surmamishetkel;
- surma kuupäev ja kellaeg juhul, kui loom sureb enne kavandatud surmamist;
- iga looma korral mürgistusnähtude algusaeg ja nende võimalik taandumine;
- iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.

Tulemuste arutelu ja tõlgendamine.

Järeldused.

4.

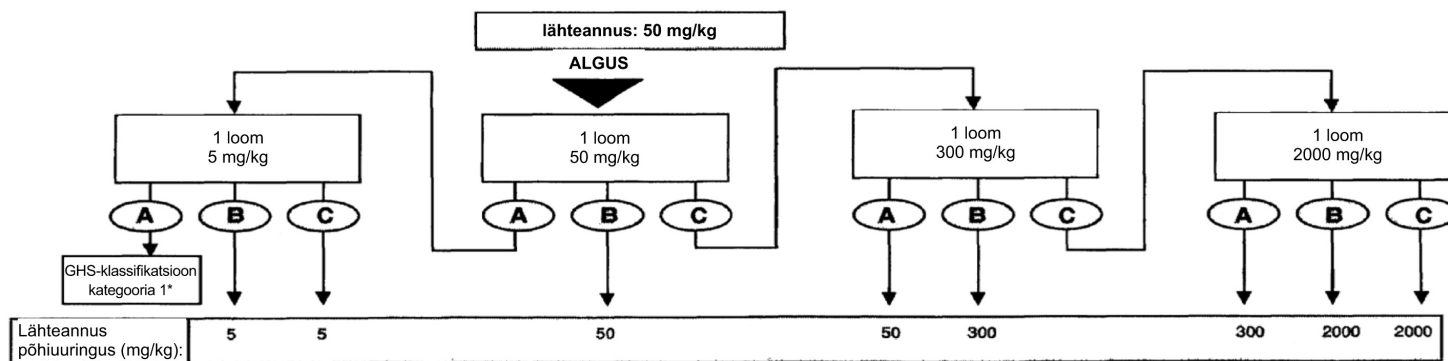
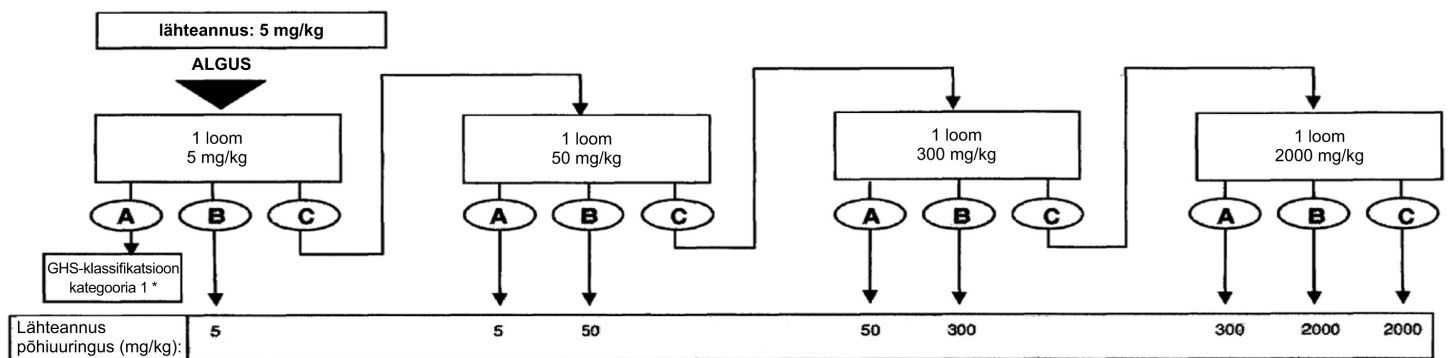
VIITED

- 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., Felling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD₅₀ test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, 469–482.
- 4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 313–324.
- 5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* 14, 315–323. *Human Exptl. Toxicol.*
- 6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21, 183–196.
- 7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Pariis
- 8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

▼B

- 9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnetl.oecd.Org/oecd/pages/home/-displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].
- 10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P, Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD₅₀, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223–231.
- 11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: *Principles and Methods of Toxicology*. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

EELKATSE VOOSKEEM



Tulemus

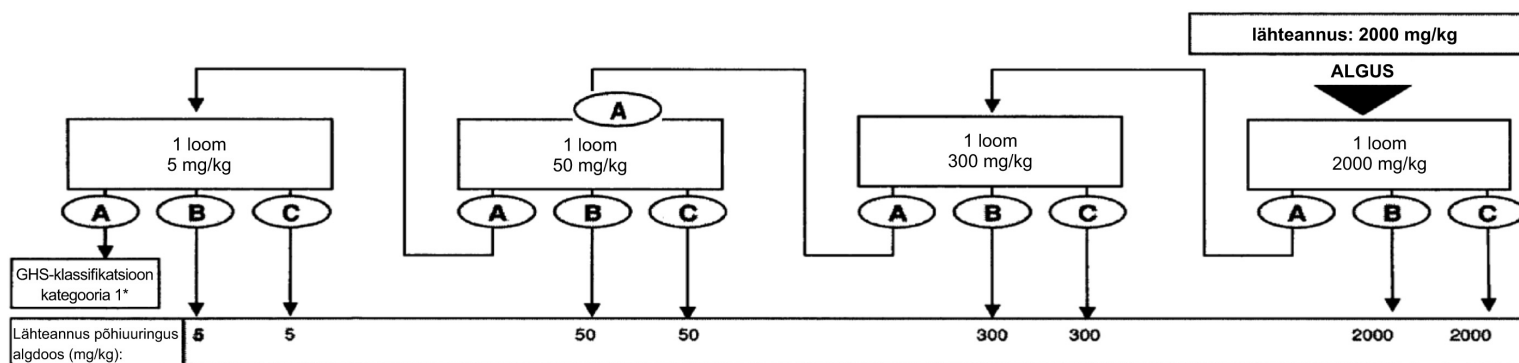
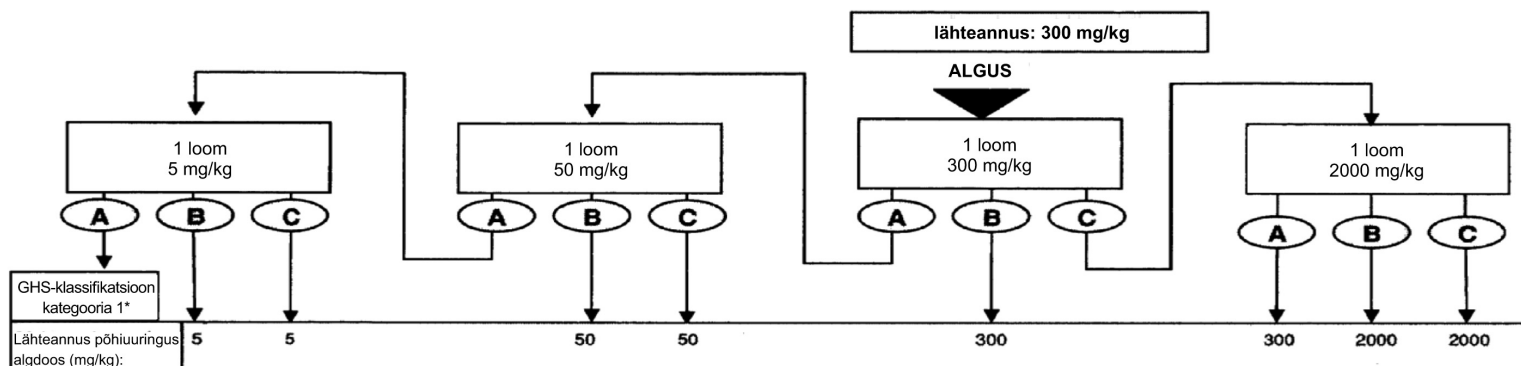
A surm

B ilmne mürgisus

C ei esine ilmselt mürgisust ega surma

* tulemuse **A** korral 5 mg/kg annusega võidakse kasutada valikulist täiendavat menetlust GHS-klassifikatsiooni kinnitamiseks: vt punkt 1.5.2

▼B

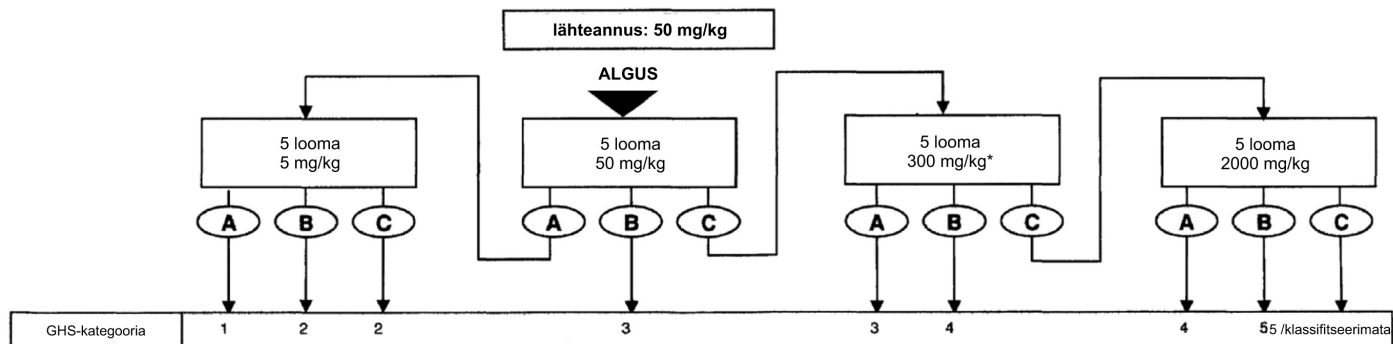
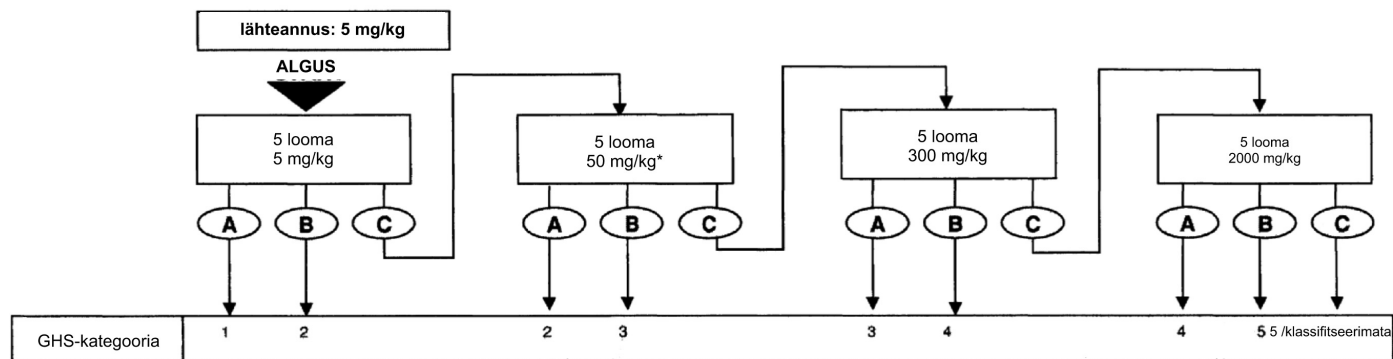


Tulemus

A	surm
B	ilmne mürgisus
C	ei esine ilmselt mürgisust ega surma

* tulemuse **A** korral 5 mg/kg annusega võidakse kasutada valikulist täiendavat protseduuri GHS-klassifikatsiooni kinnitamiseks: vt punkt 1.5.2

PÕHIURINGU VOOSKEEM



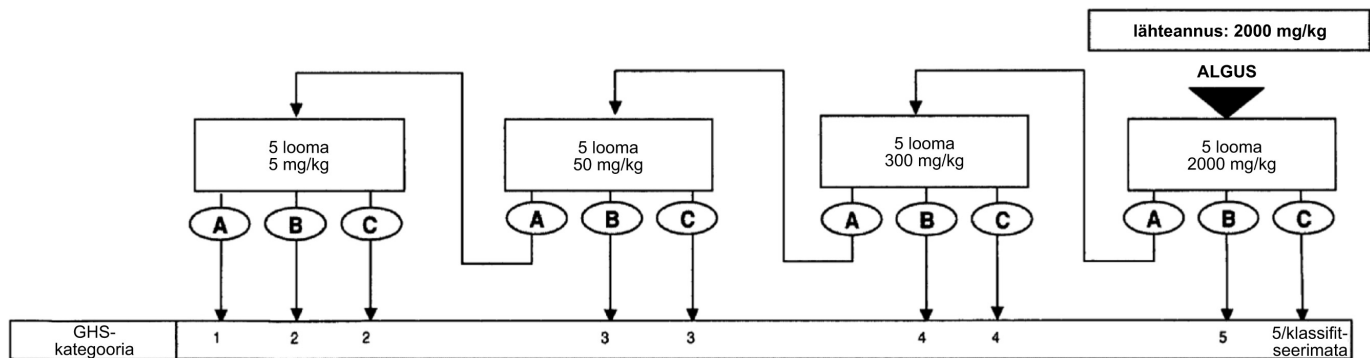
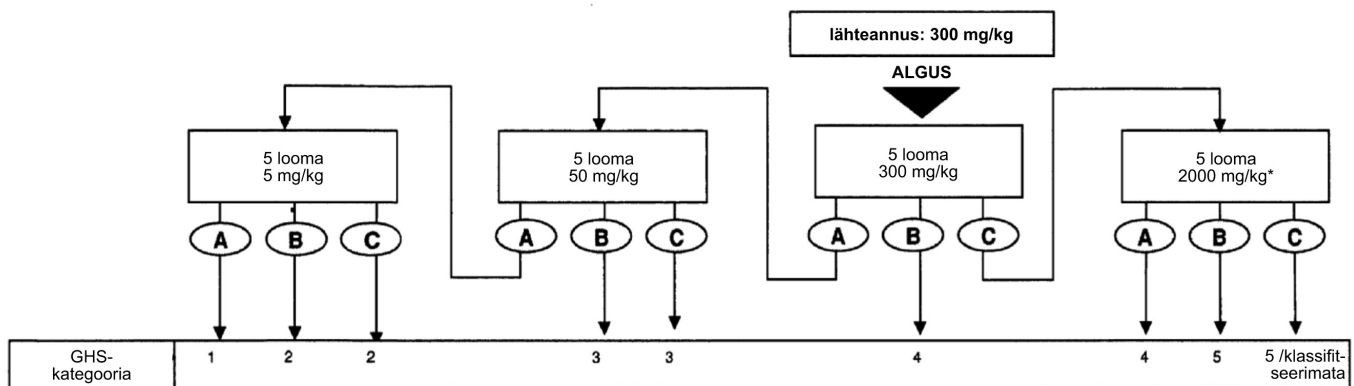
Tulemus

A	≥ 2 surma
B	≥ 1 ilmne mürgisus ja/või 1 surm
C	ei esine ilmset mürgisust ega surma

Rühma suurus
Põhiuringu igas rühmas oleva 5 looma hulka kuulub mõni eelkatses samal annusemääral uuritud loom.

* Loomade heaolu on esmajärguline
Kui see annusemäär põhjustas eelkatses surma, siis rohkem loomi ei uurita. Minge otse tulemuse **A** juurde

▼B



<u>Tulemus</u>	
A	≥ 2 surma
B	≥ 1 ilmne mürgisus ja/või 1 surm
C	ei esine ilmset mürgisust ega surma

Rühma suurus
Põhiuuringu igas rühmas oleva 5 looma hulka kuulub mõni eelkatses samal annusemääral uuritud loom.

* Loomade heaolu on esmajärguline
Kui see annusemäär põhjustas eelkatses surma, siis rohkem loomi ei uurita. Minge otse tulemuse **A** juurde.



3. Lisa

KRITEERIUMID SELLISTE KATSEAINETE KLASSIFITSEERIMISE JAOKS, MILLE KORRAL OODATAVAD LD₅₀ VÄÄRTUSED ÜLETAVAD 2 000 MG/KG JA MIDA EI OLE VAJA UURIDA

Ohukategooriat 5 käsitlevad kriteeriumid on ette nähtud selliste katseainete identifitseerimiseks, mille korral on ägeda mürgisuse oht suhteliselt madal, kuid mis teatud tingimustel võivad ohustada tundlikke populatsioone. Nimetatud ainete LD₅₀ väärtused on oodatavalt vahemikus 2 000–5 000 mg/kg suu- või nahakaudsel manustamisel või samaväärsete annustena muude manustamisviiside korral. Katseained võidakse klassifitseerida ohukategooriasse, mis on määratletud tingimusega: 2 000 mg/kg < LD₅₀ < 5 000 mg/kg (GHS-kategooria 5), järgmistel juhtudel:

- a) kui on suunatud nimetatud kategooriasse lisas 2 toodud mis tahes katsekava korral, mis põhineb surmajuhtumitel;
- b) kui on juba olemas usaldusväärsed tõendid, mis näitavad, et LD₅₀ väärtus asub kategooriale 5 vastavas vahemikus, või muud loomauuringud või toksilised mõjud inimestel osutavad sellele, et ainel on vahetu mõju inimese tervisele;
- c) andmete ekstrapoleerimise, hindamise või mõõtmise alusel, kui määramine ohtlikumasse kategooriasse ei ole põhjendatud, ja

— usaldusväärse teabe olemasolul oluliste toksiliste mõjude kohta inimestele või

— kui täheldatakse suremust suukaudse manustamisega katsetes kuni kategooriale 4 vastavate väärtusteni või

— kui eksperdiarvamus kinnitab mürgisuse olulisi kliinilisi tunnuseid katsetamisel kuni kategooriale 4 vastavate väärtusteni, välja arvatud kõhulahutus, piloereksioon või hoolitsemata välimus, või

— kui eksperdiarvamus kinnitab usaldusväärset teavet võimalike märkimisväärsede ägedate mõjude kohta muude loomauuringute põhjal.

KATSETAMINE 2 000 MG/KG ÜLETAVATE ANNUSTEGA

Maksimaalset kindlat annust 5 000 mg/kg võidakse kasutada erandkorras või siis, kui see on põhjendatud konkreetsete normatiivsete vajadustega. Tunnistades vajadust kaitsta loomade heaolu, ei kiideta katsetamist annustega 5 000 mg/kg heaks ja seda kasutatakse üksnes siis, kui on suur tõenäosus, et sellise katse tulemused oleks otseselt seotud loomade või inimeste tervise kaitsega (9).

Eeluuring

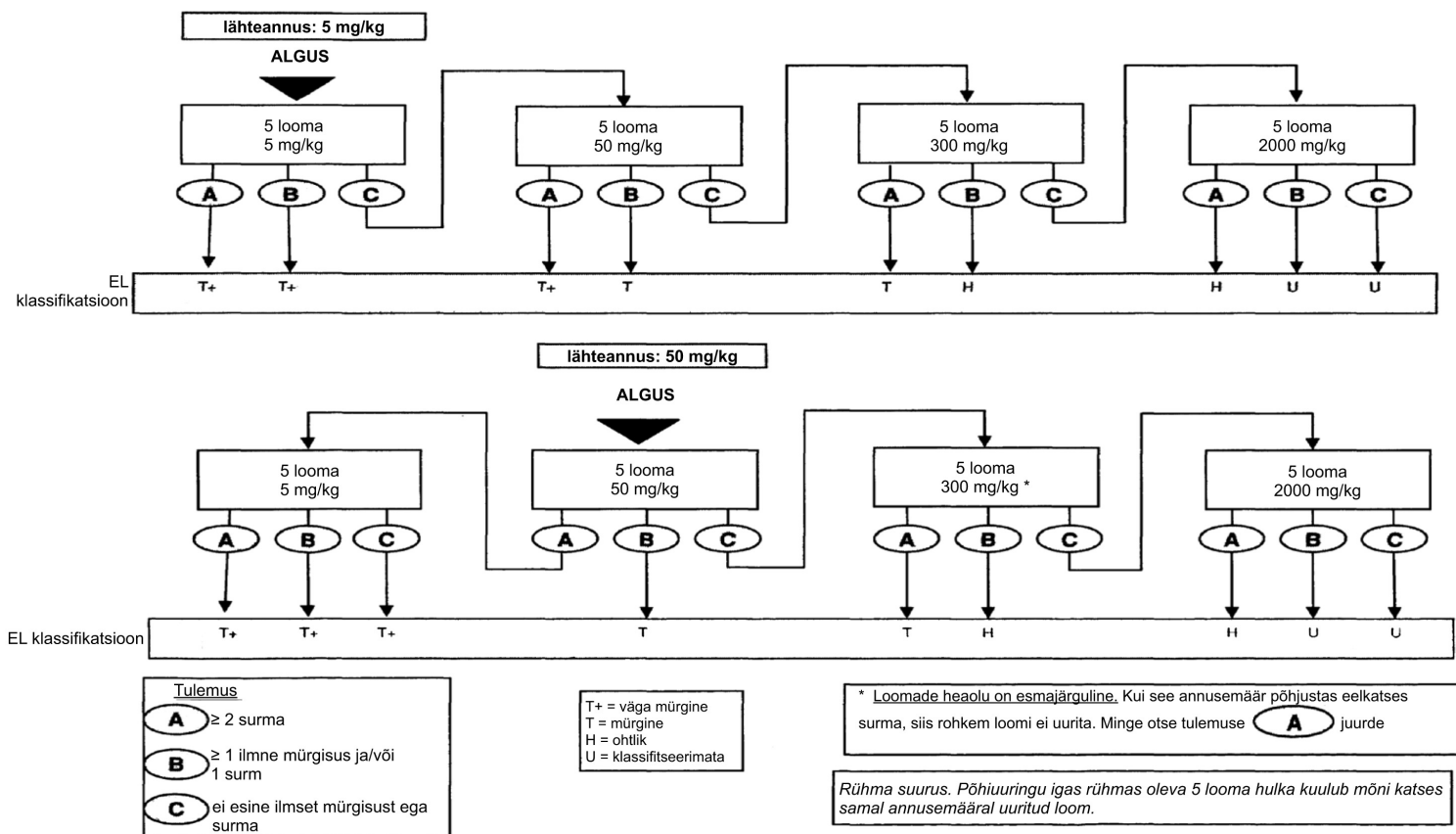
1. Iisas esitatud järjestamist reguleerivate otsuste eeskirju laiendatakse annusemäära 5 000 mg/kg kohta. Seetõttu, kui kasutatakse eeluuringus lähteannusena 5 000 mg/kg, eeldab tulemus A (surm) teise looma korral katse tegemist annusega 2 000 mg/kg; tulemused B ja C (ilmne mürgisus või ei esine mürgisust) lubavad valida põhiuuringus lähteannuseks 5 000 mg/kg. Analoogiliselt, kui lähteannusena kasutatakse 5 000 mg/kg erinevat annust, jätkatakse katset kuni annuseni 5 000 mg/kg sellisel juhul, kui annusega 2 000 mg/kg on tulemus B või C. Kui annusega 5 000 mg/kg on tulemuseks A, on põhiuuringus lähteannuseks 2 000 mg/kg. Kui tulemuseks saadaks B ja C, on põhiuuringus aldoosiks lähteannuseks 5 000 mg/kg.

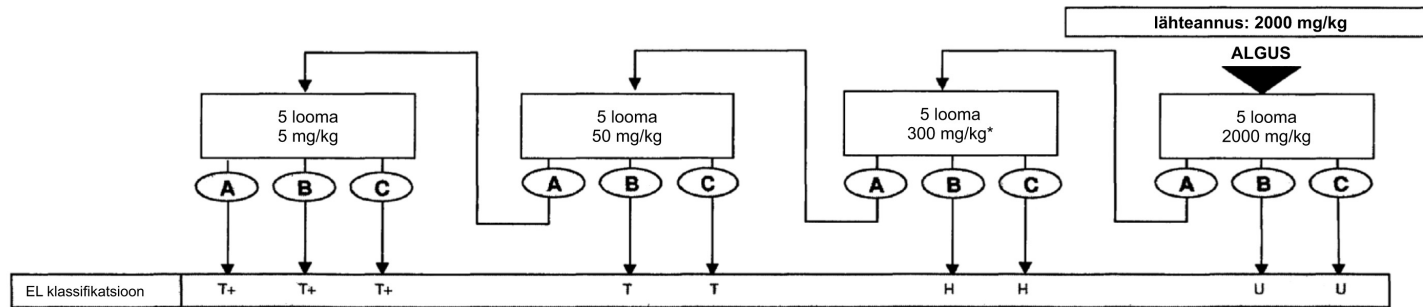
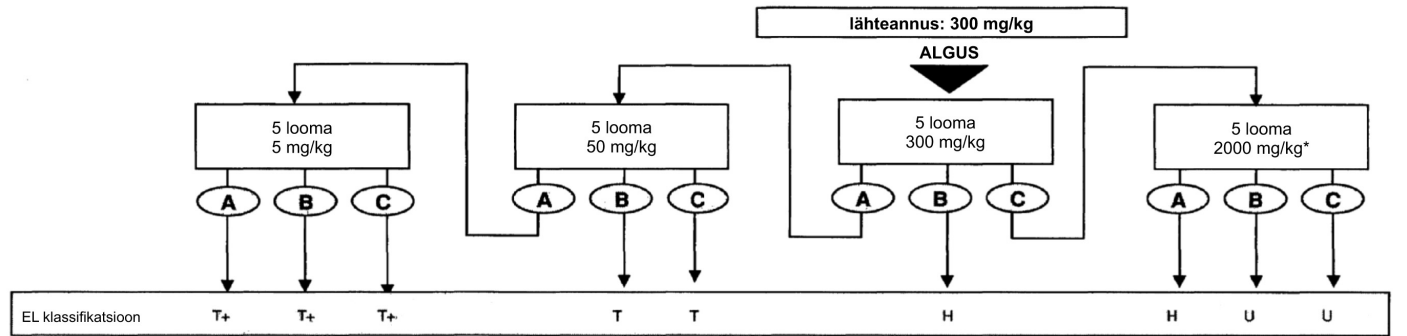
▼B**Põhiuuring**

2. lisas esitatud järjestamist reguleerivate otsuste eeskirju laiendatakse annusemäära 5 000 mg/kg kohta. Seetõttu, kui kasutatakse põhiuuringus lähteannusena 5 000 mg/kg, eeldab tulemus A (≥ 2 surma) teise rühmaga katse tegemist annusega 2 000 mg/kg; tulemuste B (ilmne mürgisus ja/või ≤ 1 surm) või C (ei esine mürgisust) puhul on tulemuseks see, et ainet ei klassifitseerita vastavalt GHSile. Analoogiliselt, kui lähteannusena kasutatakse 5 000 mg/kg erinevat annust, jätkatakse katset kuni annuseni 5 000 mg/kg sellisel juhul, kui annusega 2 000 mg/kg on tulemus C. Kui annusega 5 000 mg/kg on tulemuseks A, klassifitseeritakse aine GHS 5. kategooriasse. Tulemuste B või C puhul jääb aine klassifitseerimata.

KATSEMEETOD B.1a

EÜ süsteemi kohased klassifitseerimisjuhised, mida kasutatakse üleminekuperioodil kuni globaalselt harmoneeritud süsteemi (GHS) täieliku rakendamiseni (viites (8))





Tulemus

A ≥ 2 surma

B ≥ 1 ilmne mürgisus ja/või 1 surm

C ei esine ilmselt mürgisust ega surma

T+ = väga mürgine
 T = mürgine
 H = ohtlik
 U = klassifitseerimata

Loomade heaolu on esmajärguline
 Kui see annusemäär põhjustas eelkatses surma, siis rohkem loomi ei uurita. Minge otse tulemuse **A** juurde

*** Rühma suurus**
 Põhiuuringu igas rühmas oleva 5 looma hulka kuulub mõni katses samal annusemääral uuritud loom.

▼B**B.1b. ÄGE SUUKAUDNE MÜRGISUS – ÄGEDA MÜRGISUSASTME MEETOD****1. MEETOD**

See katsemeetod on samaväärne OECD TG 423ga (2001).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolevas katses sätestatud ägeda mürgisusastme meetod (1) on astmeline meetod, mille igal etapil kasutatakse kolme samast soost looma. Olenevalt loomade suremusest ja/või sellest, kas loomad on suremas, on katseaine ägeda mürgisuse hindamiseks vaja keskmiselt 2–4 etappi. Käesolev protseduur on korratav, selles kasutatakse väga vähe loomi. Selle abil võidakse järjestada ained nii nagu muude ägeda mürgisuse katsemeetodite puhul. Ägeda mürgisusastme meetod põhineb biomeetrilistel hindamistel (2, 3, 4, 5), kus kasutatakse kindlaid annuseid, mis on üksteisest piisavalt eraldatud aine klassifitseerimise eesmärgil ja ohu hindamiseks. 1996. aastal vastu võetud meetodit valideeriti ulatuslikult *in vivo*, võrreldes kirjandusest saadud LD₅₀ väärtusi käsitlevaid andmeid nii riiklikul (6) kui ka rahvusvahelisel tasandil (7).

Juhised antud eesmärgi saavutamiseks kõige sobivama katsemeetodi valimiseks võib leida ägeda suukaudse mürgisuse katseid käsitlevast (8) juhisdokumentidist. Nimetatud juhisdokument sisaldab samuti lisateavet B.1b katsemeetodi rakendamise ja tõlgendamise kohta.

Katseaineid ei ole vaja manustada annustes, mis teadaolevalt põhjustavad märkimisväärset valu ja kannatusi sööbiva või tugeva ärritava toime tõttu. Suremas olevad loomad ja loomad, kes kannatavad ilmselgelt valu või kellel ilmnevad tõsiste või kestvate kannatuste tunnused, tuleks surmata humaanselt; need loomad võetakse arvesse katsetulemuste tõlgendamisel samamoodi nagu katse käigus surnud loomi. Eraldi juhisdokumentis (9) on esitatud kriteeriumid, mille alusel tehakse otsus suremas olevate või tõsiselt kannatavate loomade surmamise kohta, ning juhised prognoositava või ähvardava surma äratundmiseks.

Meetod kasutab kindlaks määratud annuseid ja tulemused võimaldavad aineid järjestada ja klassifitseerida vastavalt ägedat mürgisust põhjustavate kemikaalide klassifitseerimist käsitlevale globaalselt harmoneeritud süsteemile (10).

Põhimõtteliselt ei ole meetod ette nähtud võimaldama arvutada täpset LD₅₀ annust, kuid võimaldab kindlaks määrata määratletud kokkupuutevahemikku, kus suremus on eeldatav, kuna käesoleva katse põhipunkt on endiselt see, et osa loomi sureb. Meetod võimaldab kindlaks määrata LD₅₀ väärtuse üksnes siis, kui vähemalt kaks annust põhjustavad suremuse, mis on 0 %st suurem ja 100 %st väiksem. Tänu kindlaksmääratud annuste valikule sõltumata katseainest, ja klassifitseerimise selgelt väljendatud seosele erinevas seisundis täheldatud loomade arvuga on laborite aruanded järjepidevamad ja korratavamad.

▼B

Katselaboratoorium võtab arvesse kogu katseaine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave sisaldab aine nimetust ja keemilist struktuuri, selle füüsikalisi-keemilisi omadusi, muude ainetega *in vitro* või *in vivo* tehtud mürgisuskatsete tulemusi, struktuurilt sarnaste ainete toksikoloogilisi andmeid ja aine eeldatavat otstarvet. Selline teave on vajalik kõikide asjaosaliste veenmiseks, et katse on tähtis inimeste tervise kaitsmiseks ja aitab valida sobivat lähteannust.

1.2. MÕISTED

Äge suukaudne mürgisus – viitab sellistele kahjulikele mõjudele, mis ilmnevad pärast aine suukaudselt manustamist ühekordse annuse või seeriaviisiliste annustena 24 tunni jooksul.

Edasilükkunud surm – loom ei sure ega näi olevat suremas 48 tunni jooksul, kuid sureb hiljem, 14päevase jälgimisperioodi jooksul.

Annus – manustatava katseaine kogus. Annust väljendatakse katseaine massina katselooma massiühiku kohta (nt mg/kg).

GHS – Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures (keemiliste ainete ja segude globaalselt harmoneeritud klassifitseerimissüsteem). Ühistegevus, milles osalevad OECD (inimeste tervis ja keskkond), ohtlike ainete vedu käsitlev ÜRO eksperdikomitee (füüsikalisi-keemilised omadused) ja ILO (ohtudest teavitamine) ning mida koordineerib kemikaalide mõistlikku haldamist käsitlev organisatsioonidevaheline programm (IOMC).

Ähvardav surm – loom on suremas või sureb tõenäoliselt enne järgmist kavandatud jälgimisperioodi. Närilistel võiksid sellisele seisundile viitavateks märkideks olla krambid, külili magamine, loidus ja värin (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumentis (9)).

LD₅₀ (surmava suukaudse annuse mediaan) – aine statistiliselt määratletud ühekordne annus, mis tõenäoliselt põhjustab suukaudsel manustamisel surma 50 %l loomadest. LD₅₀ väärtust väljendatakse katseaine massina katselooma massiühiku kohta (mg/kg).

Piirannus – vastab katses kasutatavale maksimaalsele annusele (2 000 või 5 000 mg/kg).

Surmaeelne seisund – loomad, kes on suremas või kes ei suuda ellu jääda ravist hoolimata (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumentis (9)).

Ennustatav surm – selliste kliiniliste tunnuste olemasolu, mis viitavad sellele, et surm saabub teatud aja pärast enne katse kavandatavat lõppu; näiteks suutmatus tarbida vett või toitu (vt üksikasjalikumaid andmeid humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumentis (9)).

▼B

1.3. KATSE PÕHIMÕTE

Tuginedes protseduurile, mille kohaselt kasutatakse igal etapil minimaalset arvu loomi, on katse põhimõtteks saada aine klassifitseerimiseks piisavalt teavet katseaine ägeda mürgisuse kohta. Ainet manustatakse katseloomade rühmale suukaudselt ühe kindlaksmääratud doosina. Ainet katsetatakse etapiviisiliselt, igal etapil kasutatakse kolme ühest soost looma (tavaliselt emaslooma). Ühendiga seotud suremuse puudumine või esinemine loomadel, kellele ühel etapil annustati ainet, määrab kindlaks järgmise etapi, s.t:

— lisakatseid ei ole vaja;

— aine sama annus manustatakse veel kolmele loomale;

— ainet manustatakse vastavalt vahetult järgmisele või eelmisele annusemäärale veel kolmele loomale.

Katseprotseduuri üksikasju on kirjeldatud 1. lisas. Meetod võimaldab langetada otsuse seoses katseaine klassifitseerimisega ühte mürgisuse kategooriasse, mis on määratletud kindlaksmääratud LD₅₀ piirväärtuse põhjal.

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1. Loomaliikide valik

Eelistatud näriliste liik on rotid, kuigi võib kasutada ka näriliste teisi liike. Tavaliselt kasutatakse emasloomi (9). Selle põhjuseks on, et tavapäraseid LD₅₀ katseid käsitlevad kirjandusülevaated näitavad, et sugupoolte tundlikkuses on vähe erinevusi, kuid neil juhtudel, kui on erinevusi täheldatud, on emasloomad üldiselt veidi tundlikumad (11). Kui struktuurselt sarnaste kemikaalide toksikoloogilisi või toksikokiinetilisi omadusi käsitlevatest andmetest nähtub, et isasloomad on tõenäoliselt tundlikumad, siis kasutatakse neid. Kui katse tehakse isasloomadega, tuleks esitada piisav põhjendus.

Kasutatakse noorte tervete täiskasvanud loomade enim kasutatavaid laboritüvesid. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Iga loom peaks annustamise alustamisel olema 8–12 nädalat vana ning tema mass ei tohiks erineda rohkem kui $\pm 20\%$ varem annuse saanud loomade keskmisest massist.

1.4.2. Loomade pidamise ja toitmise tingimused

Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise aja, peaks seda hoidma vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Toitmisel võib kasutada tavapäraselt labori toiduvalikut koos piiramatul hulgal joogiveega. Loomad võib grupeerida puuridesse annuse põhjal, kuid puuris olevate loomade arv ei tohiks takistada iga looma selget jälgimist.

▼B**1.4.3. Loomade ettevalmistamine**

Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise jaoks ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise alustamist, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega.

1.4.4. Annuste valmistamine

Üldiselt manustatakse katseaineid kasutatavate annuste vahemikus konstantses mahus nii, et muutub annustatava valmistise kontsentratsioon. Kui uuritakse vedelat lõppsaadust või segu, võib lahjendamata katseaine kasutamine, s.t konstantse kontsentratsiooni juures, olla siiski olulisem nimetatud aine hilisemal riskianalüüsil, ja see on mõnede reguleerivate asutuste nõue. Kummalgi juhul ei tohi ületada manustamisel annuste suurimat mahtu. Vedeliku suurim ühekordselt manustatav maht sõltub katselooma suurusest. Näriliste puhul ei tohiks maht tavaliselt ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta; vesilahuste puhul võib siiski manustada 2 ml 100 g kehamassi kohta. Annuste valmistise koostamiseks on soovitatav võimaluse korral kasutada vesilahust/suspensiooni/emulsiooni, tähtsuse järjekorras oleks järjestus järgmine: lahus/suspensioon/emulsioon õlis (nt maisiõli) ja seejärel muudel kandeainetel põhinev lahus. Veest erinevate kandeainete puhul peaks kandeaine toksikoloogilised omadused olema teada. Annused tuleb valmistada ette natuke aega enne manustamist, välja arvatud juhul, kui valmistise stabiilsus sellel ajavahemikul, mil seda kasutatakse, on teada ja näib aktsepteeritav.

1.5. PROTSEDUUR**1.5.1. Annuste manustamine**

Katseainet manustatakse ühekordse annusena söögitoru kaudu või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Erandkorras, kui ühekordne annus ei ole võimalik, võib annust manustada väiksemates kogustes kuni 24 tunni jooksul.

Loomad peaksid enne doosi manustamist paastuma (nt rotte hoitakse söömata terve öö ja hiiri 3–4 tundi, üksnes vesi on saadaval). Paastumise järel loomi kaalutakse ja manustatakse katseainet. Pärast aine manustamist võib hoida rotte söömata veel 3–4 tundi ja hiiri 1–2 tundi. Kui annust manustatakse osadena teatud ajavahemiku jooksul, võib sõltuvalt ajavahemiku pikkusest osutada vajalikuks anda loomadele toitu ja vett.

1.5.2. Loomade arv ja annusemäärad

Igal etapil kasutatakse kolme looma. Lähteannusena kasutatav annusemäär valitakse üks neljast kindlast suurusest – 5, 50, 300 ja 2 000 mg/kehamassi kg. Lähteannuse määr peaks olema sellise väärtusega, mis kutsub suurima tõenäosusega esile suuremust mõnede loomade hulgas, kellele ainet manustati. 1. lisa toodud vooskeemid kirjeldavad protseduure, mida tuleks järgida iga lähteannuse puhul. Lisaks sellele antakse 4. lisa juhiseid EL süsteemi kohase klassifitseerimise kohta enne uue GHSi kasutuselevõttu.

▼B

Kui olemasolev teave kinnitab, et suremus on ebatõenäoline suurima algsuosi taseme juures (2 000 mg/kg kehamassi kohta), tuleks teha piirkatse. Kui puudub teave uuritava aine kohta, soovitatakse loomade heaolu tagamiseks kasutada algsuosi 300 mg/kg kehamassi kohta.

Katserühmadele annustamiste ajavahemik määratakse kindlaks mürgisustunnuste algushetke, kestuse ja raskuse abil. Järgmise annuse manustamist loomadele tuleb edasi lükata hetkeni, kuni juba annuse saanud loomade ellujäämine on kindel.

Maksimaalset kindla annuse määra 5 000 mg/kg võidakse kasutada erandkorras ja ainult siis, kui see on põhjendatud konkreetsete normatiivsete vajadustega (vt 2. lisa). Loomade heaolu pärast ei ole soovitud loomkatsete tegemisel GHS 5. kategooria (2 000 – 5 000 mg/kg) annus ja seda tuleks kasutada üksnes siis, kui on eriti tõenäoline, et sellise katse tulemustel on otsene tähtsus inimeste ja loomade tervise või keskkonna kaitsmisel.

1.5.3. Piirkatse

Piirkatset kasutatakse peamiselt olukordades, kus eksperimentaatoril on teavet selle kohta, et katsematerjal ei ole tõenäoliselt mürgine, s.t selle mürgisus ületab üksnes normatiivseid piirannuseid. Teavet katsematerjali mürgisuse kohta võib saada samalaadseid uuritud ühendeid, segusid või tooteid käsitlevatest teadmistest, võttes arvesse toksikoloogiliselt oluliste koostisosade olemust ja protsendimäära. Sellistel juhtudel, kui on vähe teavet mürgisuse kohta või see puudub üldse või kui katsematerjal on eeldatavasti mürgine, tuleks sooritada põhikatse.

Piirkatse võidakse teha ühel annusemääral (2 000 mg/kg kehamassi kohta) kuue loomaga (kolm looma igal etapil). Erandkorras võib piirkatse teha ühel annusemääral (5 000 mg/kg) kolme loomaga (vt 2. lisa). Kui esineb katseainega seotud suremust, võib sooritada lisakatseid astme võrra madalama annusemääraga.

1.6. VAATLUSED

Loomi jälgitakse individuaalselt pärast annustamist vähemalt esimese 30 minuti jooksul, perioodiliselt esimese 24 tunni jooksul, erilist tähelepanu pööratakse esimese nelja tunni jooksul ja seejärel iga päev kokku 14 päeva jooksul, välja arvatud juhul, kui loomad tuleb kõrvaldada uuringust ja surmata humaanselt loomade heaolu pärast või kui nad leitakse surmuna. Vaatluse kestust ei tuleks siiski jäigalt määratleda. See tuleks kindlaks määrata toksiliste reaktsioonide, nende algushetke ja taastusperioodi pikkuse põhjal ja seda võib seepärast vajaduse korral pikendada. Mürgisuse nähtude ilmumise ja kadumise aeg on tähtis, eriti siis, kui on tendents, et mürgisusnähtud võivad ilmneda hilistumisega (12). Kõik vaatlused registreeritakse süstemaatiliselt, säilitades iga looma kohta eraldi andmed.

▼B

Lisavaatlused on vajalikud siis, kui loomadel on jätkuvalt mürgisuse tunnused. Vaatlused peaksid hõlmama muutusi nahal ja karvkattes, silmades ja limaskestades ning samuti muutusi hingamissüsteemis, vereringes, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomo-toorses tegevuses ja käitumises. Tähelepanu peaks olema suunatud värvinate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma jälgimisele. Arvesse tuleks võtta humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhisdokumendis (9) esitatud põhimõtteid ja kriteeriume. Suremas olevad loomad või loomad, kellel on tugev valu või tugeva kannatuse kestvad tunnused, tuleks surmata humaanselt. Kui loomad surmatakse humaansel viisil või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.

1.6.1. Kehamass

Iga looma mass tuleks määrata kindlaks veidi enne katseaine manustamist ja seejärel vähemalt kord nädalas. Massi muutused tuleks arvutada ja protokollida. Katse lõpus ellu jäänud loomad kaalutakse ja siis surmatakse humaanselt.

1.6.2. Patoloogia

Kõik katseloomad (kaasa arvatud need, kes surid katse käigus või kõrvaldatakse uuringust loomade heaolu tagamiseks) lahatakse. Kõik üldpatoloogilised muutused tuleks iga looma puhul protokollida. Esialgse annustamise järel 24 või enam tundi elus püsinud loomade üldpatoloogiliste muutustega organeid võidakse samuti uurida mikroskoopiliselt, kuna see võib anda kasulikku teavet.

2. ANDMED

Andmed esitatakse iga üksiku looma kohta. Lisaks sellele tuleb kõik andmed esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates ära iga katserühma puhul osalevate loomade arvu, mürgisusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahanguel tehtud leiud.

3. ARUANDLUS**3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne peab sisaldama võimaluse korral järgmist teavet.

Katseaine:

— füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalised-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerimine);

— identifitseerimiseks vajalikud andmed, kaasa arvatud CASi number.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valiku põhjendus, kui see on veest erinev.

Katseloomad:

— kasutatud liigid/tüved;

▼B

- loomade mikrobioloogiline seisund, kui see on teada;
- loomade arv, vanus ja sugu (sh vajaduse korral põhjendus isasloomade kasutamise kohta emasloomade asemel);
- päritolu, pidamistingimused, toitumine jne.

Katsetingimused:

- katseaine valmistamise üksikasjad, sh üksikasjad manustatava aine füüsilise oleku kohta;
- katseaine manustamise üksikasjad, sh annuste mahud ja annustamise aeg;
- üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);
- põhjendus lähteannuse valikuks.

Tulemused:

- tabelid iga looma (st loomad, kellel on mürgisustunnused, kaasa arvatud suremus, mõjude laad, ägedus ja kestus) reageerimise andmete ja annusemäärade kohta;
- tabelid kehamassi ja kehamassi muutuste kohta;
- iga looma mass annustamispäeval, seejärel nädalaste intervallidega ja surma- või surmamishetkel;
- surma kuupäev ja kellaaeg juhul, kui loom sureb enne kavandatud surmamist;
- iga looma korral mürgisusnähtude algusaeg ja nende võimalik taandumine;
- iga looma lahangleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.

Tulemuste arutus ja tõlgendamine.

Järeldused.

4.

VIITED

- 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/LC₅₀ 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://webnetl.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 LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223–231.
- 12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. *Principles and Methods of Toxicology*. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

▼B

I. LISA

PROTSEDUUR, MIDA JÄRGITAKSE IGA LÄHTEANNUSE PUHUL

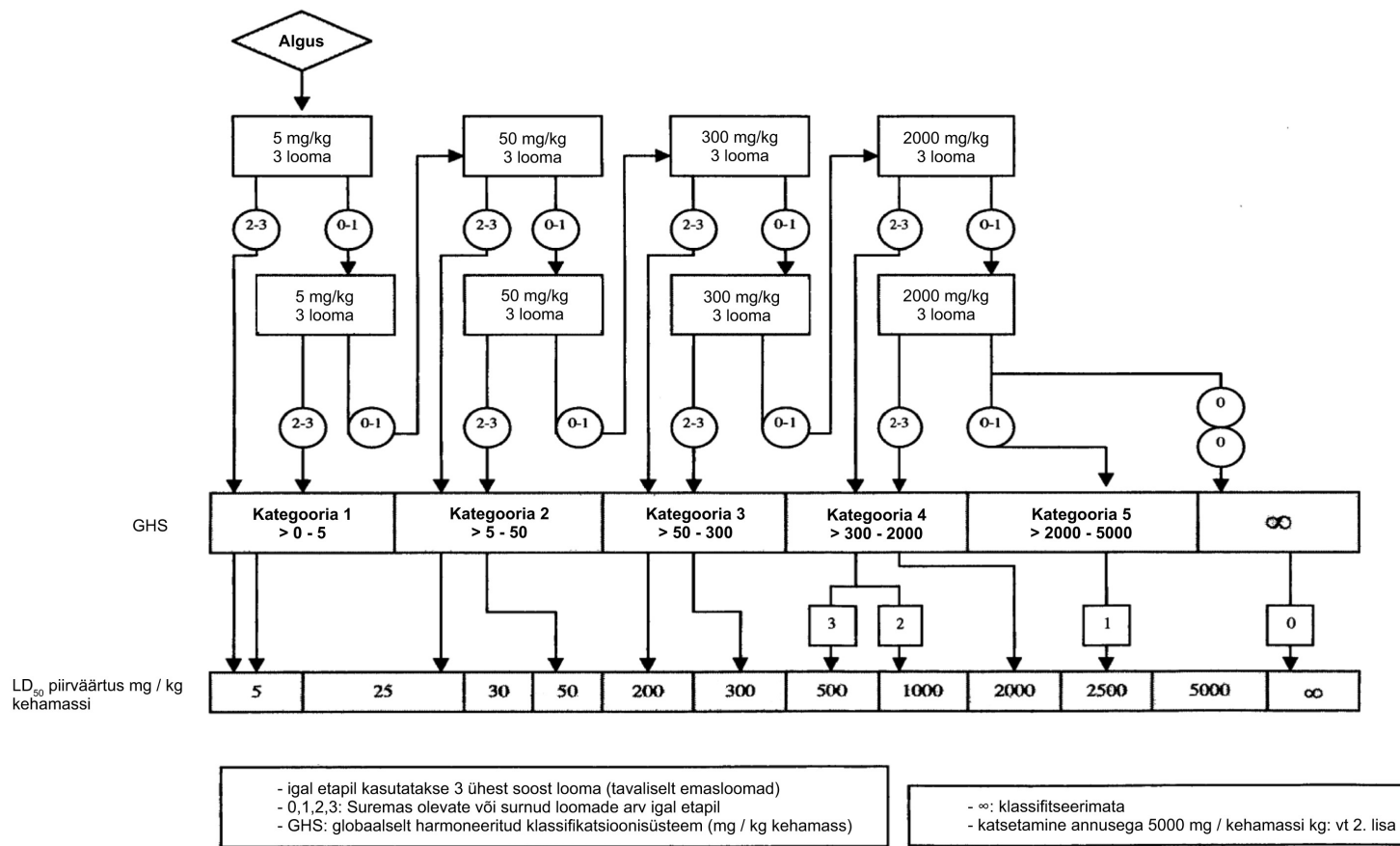
ÜLDISED MÄRKUSED

Selles lisa toodud vastavad katsekavad selgitavad protseduuri, mida tuleb järgida iga lähteannuse puhul.

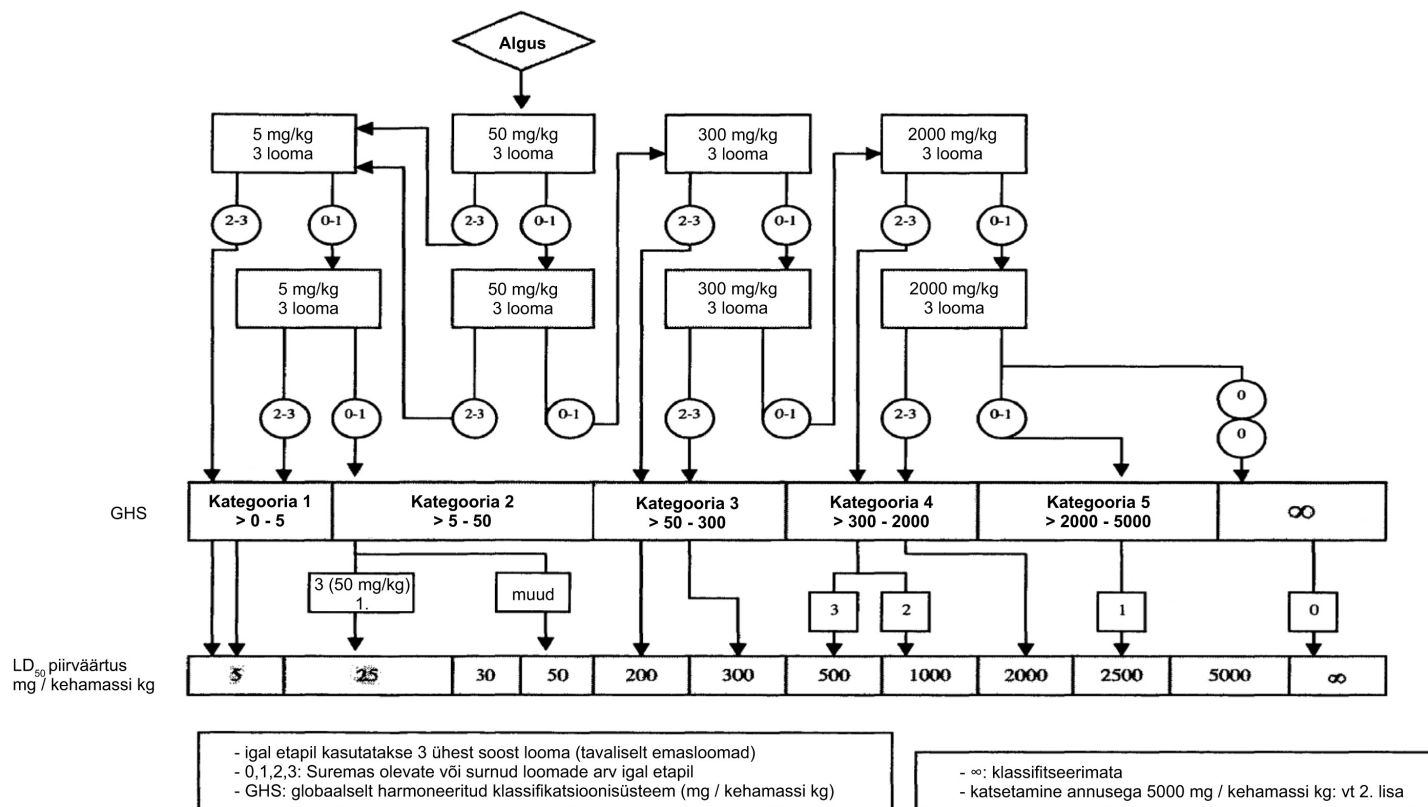
- 1a lisa: lähteannus on 5 mg kg kehamassi kohta
- 1b lisa: lähteannus on 50 mg kg kehamassi kohta
- 1c lisa: lähteannus on 300 mg kg kehamassi kohta
- 1d lisa: lähteannus on 2 000 mg kg kehamassi kohta

Humaanselt surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseprotseduuris vastavalt nooltega näidatud suunale.

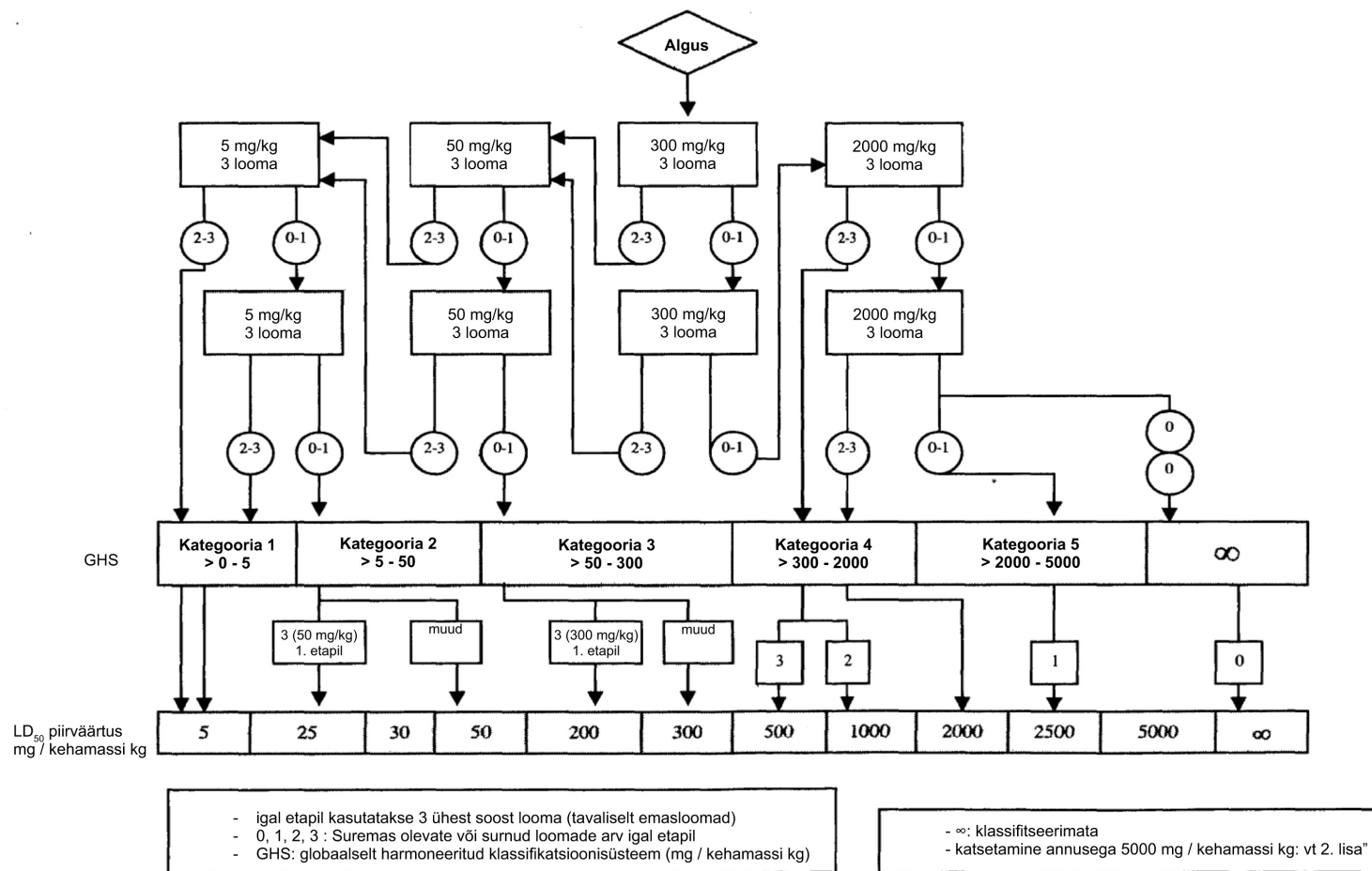
KATSEPROTSEDUUR LÄHTEANNUSE 5 MG/KEHAMASSI KG KORRAL



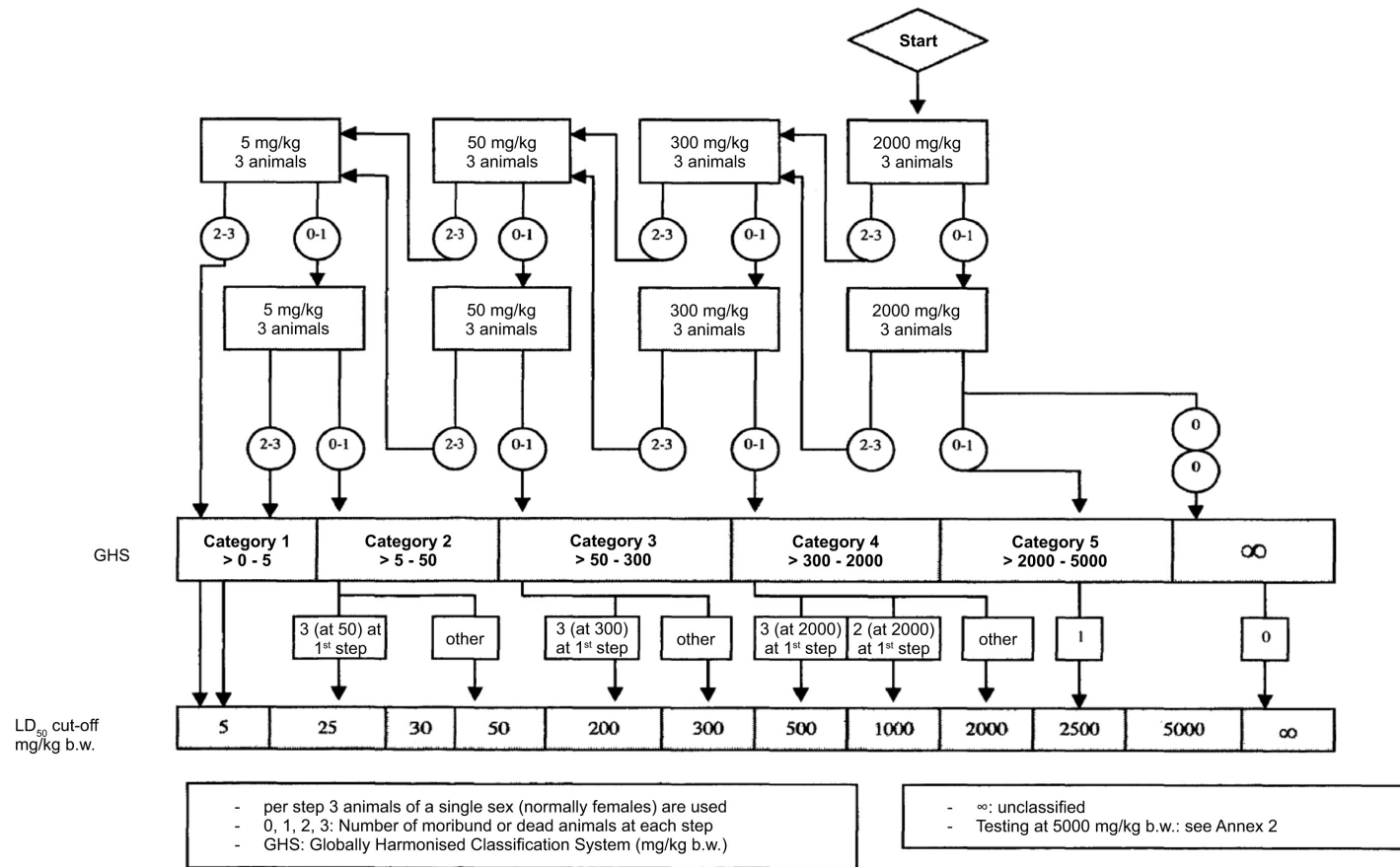
KATSEPROTSEDUUR LÄHTEANNUSE 50 MG/KEHAMASSI KG KORRAL



KATSEPROTSEDUUR LÄHTEANNUSE 300 MG/KEHAMASSI KG KORRAL



KATSEPROTSEDUUR LÄHTEANNUSE 2 000 MG/KEHAMASSI KG KORRAL





2. LISA

KLASSIFITSEERIMISKRITEERIUMID SELLISTE KATSEAINETE KORRAL, MILLE OODATAVAD LD₅₀ VÄÄRTUSED ÜLETAVAD 2 000 MG/KG JA MIDA EI OLE VAJA TESTIDA

Ohukategooriat 5 käsitlevad kriteeriumid on ette nähtud selliste katseainete identifitseerimiseks, mille korral on ägeda mürgisuse oht suhteliselt väike, kuid mis teatud tingimustel võivad ohustada tundlikke populatsioone. Nimetatud ainete korral on LD₅₀ väärtused oodatavalt vahemikus 2 000–5 000 mg/kg suu- või nahakaudel manustamisel või samaväärsete annustena muude manustamisviiside puhul. Katseaine võidakse klassifitseerida ohukategooriasse, mis on määratletud tingimusega: 2 000 mg/kg < LD₅₀ < 5 000 mg/kg (GHS 5. kategooria), järgmistel juhtudel:

- a) kui on suunatud nimetatud kategooriasse lisades 1a–1d toodud katsete tegemise mis tahes katsekava poolt, mis põhineb surmajuhthumitel;
- b) kui on juba olemas usaldusväärsed tõendid, mis näitavad, et LD₅₀ väärtus asub 5. kategooriale vastavas vahemikus, või muud loomauuringud või toksilised mõjud inimestel osutavad sellele, et ainel on vahetu mõju inimese tervisele;
- c) andmete ekstrapoleerimise, hindamise või mõõtmise alusel, kui määramine ohtlikumasse kategooriasse ei ole põhjendatud, ja
 - usaldusväärse teabe olemasolul oluliste toksiliste mõjude kohta inimestele või
 - kui täheldatakse suuremat suukaudset manustamisega katsetes kuni 4. kategooriale vastavate väärtusteni või
 - kui eksperdiarvamus kinnitab mürgisuse olulisi kliinilisi tunnuseid katsetamisel kuni 4. kategooriale vastavate väärtusteni, välja arvatud kõhulahutus, piloereksioon või hoolitsemata välimus, või
 - kui eksperdiarvamus kinnitab usaldusväärset teavet võimalike märkimisväärsete ägedate mõjude kohta muude loomauuringute põhjal.

KATSETAMINE 2 000 MG/KG ÜLETAVATE ANNUSTEGA

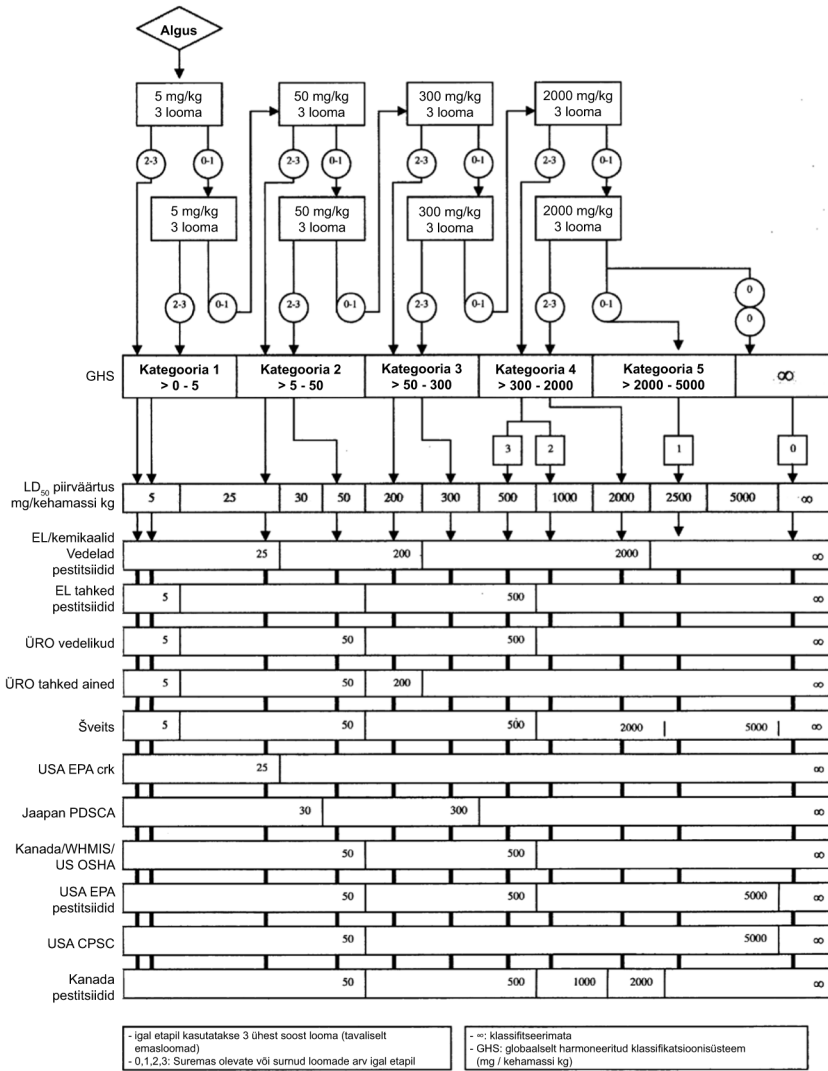
Tunnistades vajadust kaitsta loomade heaolu, ei kiideta heaks loomkatsete tegemist 5. kategooriale vastavas vahemikus (5 000 mg/kg annustega) ja seda kasutatakse üksnes siis, kui on suur tõenäosus, et sellise katse tulemused oleks otseselt seotud loomade või inimeste tervise kaitsega (10). Lisakatseid kõrgemate annusemääradega ei ole vaja teha.

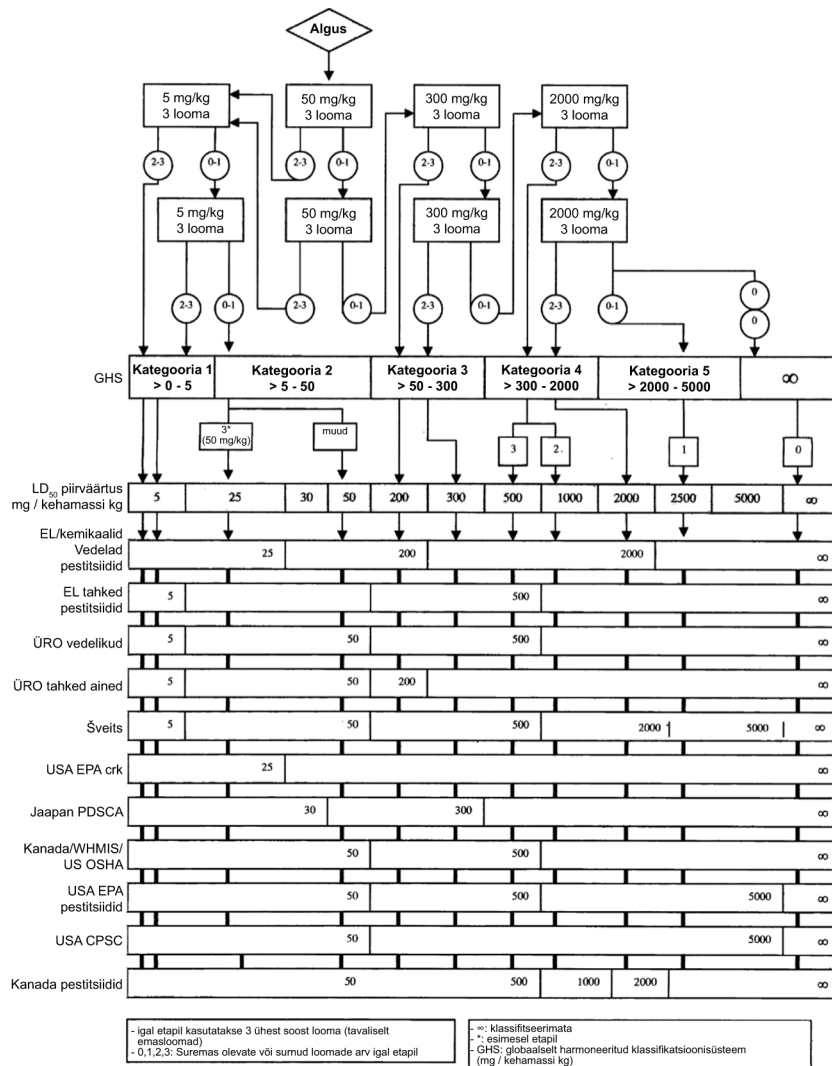
Kui katse tegemine annusega 5 000 mg/kg on nõutav, vajatakse vaid ühte etappi (st kolme looma). Kui esimese annuse saanud loom sureb, jätkatakse 2 000 mg/kg doosi manustamist vastavalt 1. lisas toodud vooskeemidele. Kui esimene loom jääb ellu, manustatakse doos ka kahele järgmisele loomale. Kui sureb vaid üks kolmest loomast, siis ületab LD₅₀ väärtus eeldatavalt 5 000 mg/kg. Kui mõlemad loomad surevad, jätkatakse manustamist annusega 2 000 mg/kg.

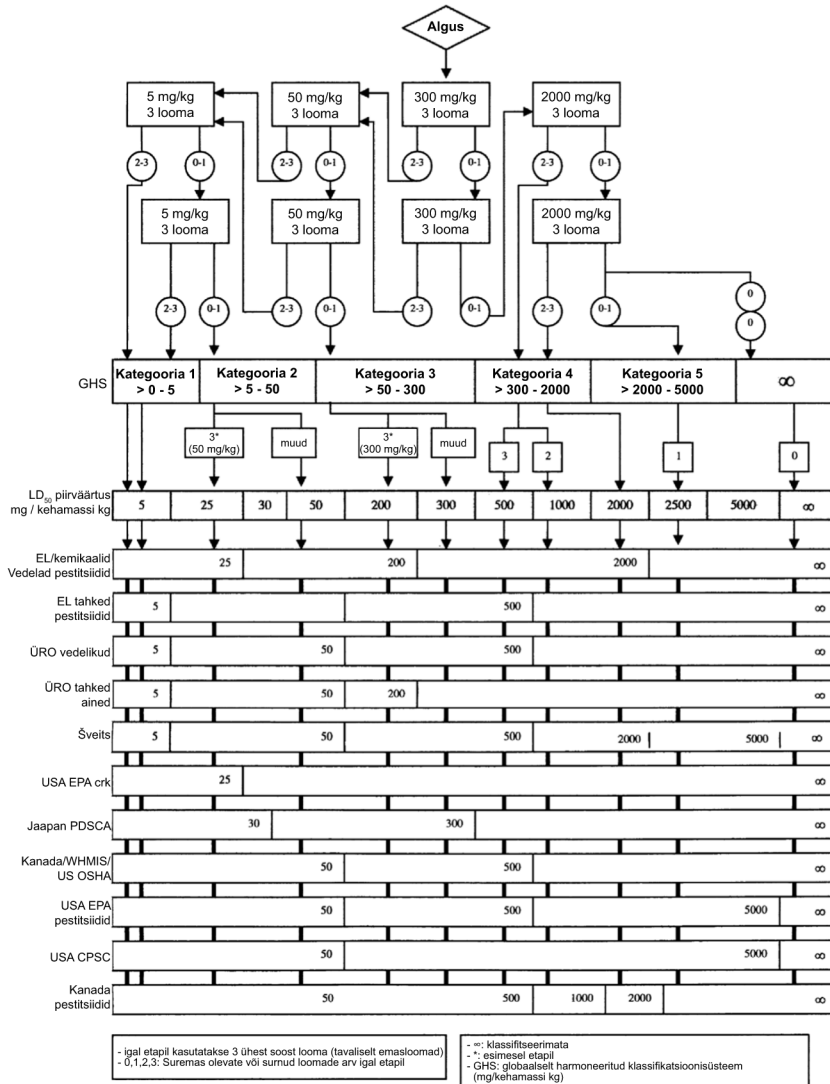
▼B

Lisa 3

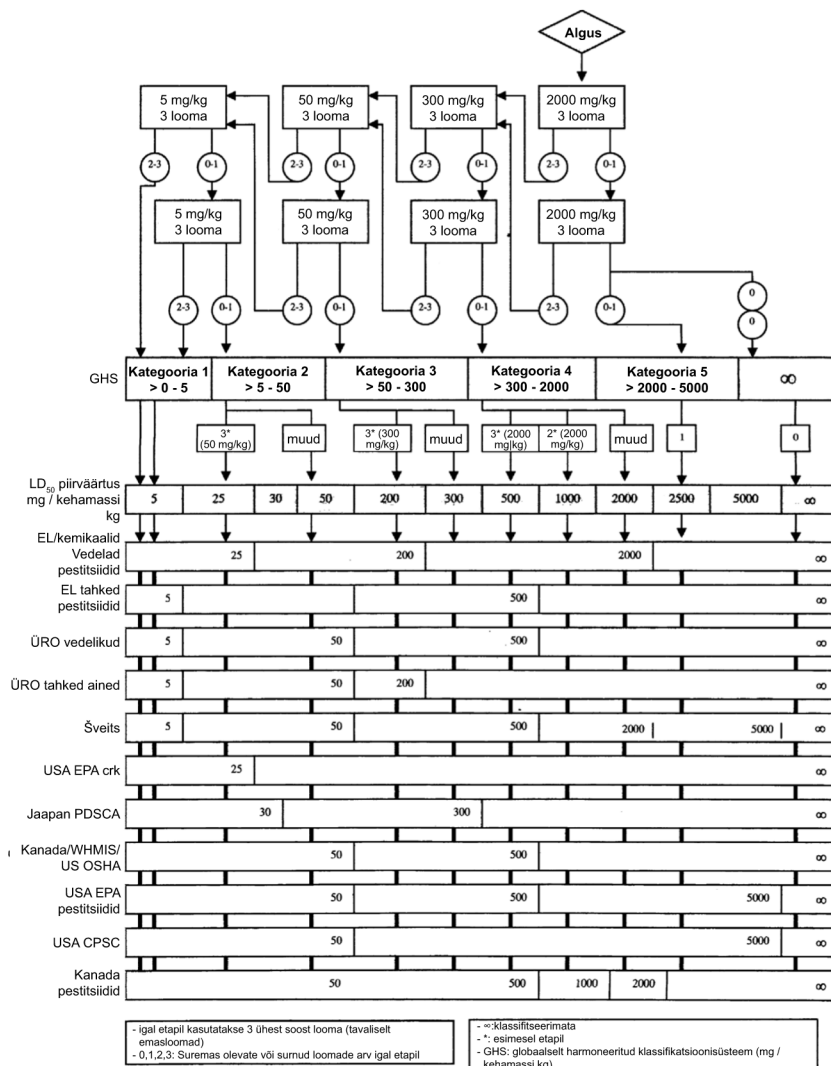
KATSEMEETOD B.1 b: EÜ süsteemi kohased klassifitseerimisjuhised, mida kasutatakse üleminekuperioodil kuni globaalselt harmoneeritud süsteemi (GHS) täieliku rakendamiseni (viite (8) alusel)







▼B



▼M4

B.2. ÄGE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 403 (2009) (1). Esialgne sissehingamisel avalduvat ägedat mürgisust käsitlev katsejuhend nr 403 võeti vastu 1981. aastal. Käesolev läbivaadatud katsemeetod B.2 (mis on samaväärne katsejuhendi nr 403 läbivaadatud versiooniga) on koostatud suurema paindlikkuse tagamiseks, loomade kasutamise vähendamiseks ja regulatiivsete vajaduste täitmiseks. Läbivaadatud katsemeetod hõlmab kahte järgmist uuringu tüüpi: tavaline LC₅₀ määramise eeskiri ja C × t (kontsentratsioon × aeg) määramise eeskiri. Käesoleva katsemeetodi peamised omadused on järgmised: meetod võimaldab määrata mõju sõltuvust kontsentratsioonist alates mitteletaalsest kuni letaalse mõjuni, et leida letaalne mediaankontsentratsioon (LC₅₀), mitteletaalse kontsentratsiooni läviväärtus (näiteks LC₀₁) ja kõvera tõus, ning määrata kindlaks mõju võimalik sõltuvus soost. C × t määramise eeskirja tuleks kasutada konkreetse regulatiivse või teadusliku vajaduse puhul, kui on vaja teha mitmesuguse kestusega loomkatsed, näiteks hädaolukorrale reageerimise kavandamiseks (nt akuutse kokkupuute näidistasemete (*Acute Exposure Guideline Levels*, AEGl) leidmine, hädaolukorras toimimise juhendite (*Emergency Response Planning Guidelines*, ERPG) kavandamine või akuutse kokkupuute läviväärtuste (*Acute Exposure Threshold Levels*, AETL) leidmine) või maakasutuse planeerimiseks.
2. Käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemise ja tõlgendamise juhendid on esitatud sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse katse juhenddokumendis (juhenddokument nr 39) (2).
3. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud selle peatüki lõpus ja juhenddokumendis nr 39 (2).
4. Käesolev katsemeetod võimaldab iseloomustada uuritavat kemikaali, hinnata kvantitatiivselt riski ning määruse (EÜ) nr 1272/2008 (3) kohaselt järjestada ja klassifitseerida uuritavat kemikaali. Juhenddokumendis nr 39 (2) on esitatud juhendid ägeda mürgisuse uurimiseks sobiva katsemeetodi valimiseks. Kui soovitakse saada ainult klassifitseerimiseks ja märgistamiseks vajalikku teavet, soovitatakse üldiselt kasutada käesoleva lisa peatükis B.52 esitatud meetodit (4) (vt juhenddokument nr 39 (2)). Käesolev katsemeetod B.2 ei ole spetsiaalselt ette nähtud erimaterjalide, nagu vähe lahustuvad isomeetriselised või kiudmaterjalid või toodetud nanomaterjalid, uurimiseks.

LÄHTEKAALUTLUSED

5. Enne käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemist peaks uurimislabor läbi vaatama kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, sh tehtud uuringud (näiteks käesoleva lisa peatükk B.52 (4)), mille andmete abil oleks võimalik täiendava katse tegemisest loobuda, et minimeerida loomade kasutust. Teave, mis võib aidata valida katseks kõige sobivama liigi, liini, soo, kokkupuuteviisi ja sobivad uuritavad kontsentratsioonid, hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalised-keemilised omadused; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed ja toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuriga ainete kohta (vt juhenddokument nr 39 (2)).

▼ **M4**

6. Võimaluste piires tuleks vältida söövitava ja/või ärritava kemikaali katsetamist kontsentratsioonil, mis eeldatavasti põhjustab suurt valu ja/või kannatusi. Söövitava/ärritava mõju võimalust tuleks hinnata eksperdihindamise abil, kasutades selliseid tõendeid nagu inimeste kogemused ja varasemad loomkatsete andmed (näiteks korduvdoosi uuringutest, mis on tehtud mitte-söövitava/-ärritava kontsentratsiooniga), olemasolevad *in vitro* andmed (näiteks käesoleva lisa peatükid B.40 (5) ja B.40a (6) või OECD katsejuhend nr 435 (7)), pH-väärtused, teave samalaadsete ainete kohta või iga muu asjakohane teave, et hinnata, kas täiendavast katsetamisest on võimalik loobuda. Konkreetse regulatiivse vajaduse jaoks (näiteks hädaolukorras tegutsemise kava koostamiseks) võidakse käesolevat katsemeetodit kasutada, et viia loomad kokkupuutesse kõnealuste materjalidega, kuna sellega saab uuringu juht või peamine uurija kontrollida sihtkontsentratsioonide valimise õigsust. Sihtkontsentratsioon ei tohiks siiski põhjustada tugevat ärritavat/söövitavat mõju, kuid peaks olema piisav, et pikendada kontsentratsiooni-mõju kõver tasemeni, millega saavutatakse katse regulatiivne ja teaduslik eesmärk. Kõnealused kontsentratsioonid tuleks valida juhtumipõhiselt ja seda valikut tuleks põhjendada (vt juhenddokument nr 39 (2)).

KATSE PÕHIMÕTE

7. Käesolev läbivaadatud katsemeetod B.2 on koostatud selleks, et saada piisavalt teavet uuritava kemikaali ägeda mürgisuse kohta, et kemikaal klassifitseerida ja saada letaalsuse andmed (näiteks LC_{50} , LC_{01} ja kõvera tõus) ühe või mõlema soo kohta, mida vajatakse riski kvantitatiivseks hindamiseks. Käesolev katsemeetod hõlmab kahte meetodit. Esimene meetod on tavaline määramiseeskiri, mille puhul loomade rühmad viiakse kokkupuutesse piirkontsentratsiooniga (piirsalduskatse) või astmeliselt mitme eri kontsentratsiooniga eelnevalt kindlaks määratud aja jooksul, mis tavaliselt on neli tundi. Konkreetse regulatiivse eesmärgi jaoks võib kasutada muid kokkupuute ajavahemikke. Teine meetod on $C \times t$ määramise eeskiri, mille puhul loomade rühmad viiakse kokkupuutesse ühe (piir)kontsentratsiooniga või mitme eri kontsentratsiooniga mitme ajavahemiku jooksul.
8. Suremas loomad või loomad, kes ilmselgelt kannatavad valu või kellel ilmnevad raskete ja kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaansel viisil surmata; selliseid loomi võetakse katsetulemuste tõlgendamisel arvesse samamoodi kui katse käigus surnud loomi. Kriteeriumid, mille põhjal tehakse suremas oleva või raskelt kannatava looma surmamise otsus, ja juhised prognoositava või läheneva surma kindlakstegemiseks on esitatud humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas OECD juhenddokumendis nr 19 (8).

MEETODI KIRJELDUS**Loomaliigi valimine**

9. Tuleks kasutada katseloomade enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud isendeid. Eelistatav loomaliik on rott; muude liikide kasutamise korral tuleks seda põhjendada.

Loomade ettevalmistamine

10. Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Kokkupuute päeval peaksid loomad olema 8 kuni 12 nädala vanused noored täiskasvanud, kelle kehamass ei tohiks erineda rohkem kui $\pm 20\%$ selliste samas vanuses ja samast soost loomade keskmisest kehamassist, keda kasutati varasemates kemikaaliga kokkupuute katsetes. Loomad valitakse juhuslikult ja märgistatakse individuaalselt. Loomi hoitakse oma puuris vähemalt viis päeva enne katse algust, et võimaldada neil laboritingimustega kohaneda. Loomad peaksid olema enne katset ka katseseadmetega lühikese aja vältel kohanenud, kuna sel viisil vähendatakse uude keskkonda viimisest põhjustatud stressi.

▼ **M4****Pidamistingimused**

11. Katseloomade pidamise ruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuigi see ei pruugi olla võimalik, kui kandeainena kasutatakse vett. Enne ja pärast kokkupuudet tuleks loomad tavaliselt paigutada soo ja kontsentratsiooni alusel rühmitatuna puuridesse, kuid loomade arv puuris ei tohiks segada iga looma täpset jälgimist ning peaks minimeerima loomade suremist kannibalismi ja võitlemise tõttu. Kui loomade kokkupuude toimub ainult nina kaudu, siis võib olla vajalik lasta neil hoiutorudega kohaneda. Hoiutorud ei tohiks põhjustada loomadele ülearuseid füüsilisi, soojusest või piiratud liikumisvõimest tingitud ebamugavusi. Loomade liikumise piiramine võib mõjutada füsioloogilisi näitajaid, näiteks kehatemperatuuri (hüpertermia) ja/või hingamise minutimahtu. Kui kättesaadavad on üldandmed, mille kohaselt kõnealuseid muutusi märkimisväärses ulatuses ei teki, siis ei ole eelnev hoiutoruga kohanemine vajalik. Kogu keha kaudu aerosooliga kokku puutuvaid loomi tuleks kokkupuute ajal eraldi hoida, et vältida loomadepoolset uuritava aerosooli filtrimist läbi oma puurikaaslaste karvkatte. Võib kasutada tavalisi ja sertifitseeritud laborisõötasid, v.a kokkupuute ajal, ning anda piiramatul kogusel kraanivett. Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.

Inhalatsioonikambriid

12. Inhalatsioonikambri valimisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali laadi ja katse eesmärki. Eelistatav kokkupuuteviis on ainult nina kaudu (mis hõlmab ainult pea, nina või koonu kaudu kokkupuudet). Ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet eelistatakse üldiselt vedelik- või pulberaerosooli ja aerosooliks kondenseeruda võiva auruga tehtavate uuringute puhul. Uuringu erieesmärgi saavutamiseks võib parem olla kokkupuude kogu keha kaudu, kuid seda tuleks katseprotokollis põhjendada. Kogukehakambri kasutamise korral keskkonna stabiilsuse tagamiseks ei tohiks katseloomade kogumaht ületada 5 % kambri mahust. Ainult nina ja kogu keha kaudu kokkupuute tehnilisi põhimõtteid ning konkreetseid eeliseid ja puudujääke on kirjeldatud juhenddokumendis nr 39 (2).

KOKKUPUUTETINGIMUSED**Kontsentratsioonide manustamine**

13. Kokkupuude ainult nina kaudu võib rottidel kesta kuni kuus tundi. Kui hiirtel kasutatakse ainult nina kaudu kokkupuudet, siis ei tohiks kokkupuude tavaliselt ületada nelja tundi. Kui vajatakse pikema kestusega uuringuid, siis tuleks seda põhjendada (vt juhenddokument nr 39 (2)). Kogukehakambris aerosoolidega kokku puutuvad loomad tuleks eraldi paigutada, et vältida puurikaaslaste karvkatte korrastamise tõttu uuritava kemikaali suukaudset manustamist. Kokkupuute ajal ei tohiks loomi sööta. Loomadele võib kogu keha kaudu toimuva kokkupuute ajal vett anda.
14. Loomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on gaas, aur, aerosool või nende segu. Katses kasutatav füüsikaline olek sõltub uuritava kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest, valitud kontsentratsioonist ja/või uuritava kemikaali kõige tõenäolisemast füüsikalisest vormist käsitsemise ja kasutamise ajal. Hügrokoopseid ja väga reaktsioonivõimelisi uuritavaid kemikaale tuleks katsetada kuiva õhu tingimustes. Tuleks olla ettevaatlik, et vältida plahvatusohtliku kontsentratsiooni tekkimist.

▼ **M4****Osakeste jaotus suuruse järgi**

15. Osakeste suurusjaotus tuleks määrata kõigi aerosoolide puhul ja samuti aurude puhul, mis võivad kondenseeruda ja moodustada aerosooli. Hingamisteede kõigi asjakohaste piirkondadega kokkupuute võimaldamiseks soovitatakse kasutada aerosoole, mille osakeste massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) on vahemikus 1–4 µm ning geomeetriline standardhälve (σ_g) on 1,5–3,0 (2, 9, 10). Kõnealuse standardi järgimiseks tuleks teha mõistlikud jõupingutused; kui standardit ei ole võimalik järgida, tuleks esitada eksperdi hinnang. Näiteks metallisuitsu osakesed võivad olla kõnealusest normväärtusest väiksemad ning laenguga osakesed, kiud ja hügrokoopseid materjale (mille suurus hingamisteede niiskes keskkonnas suureneb) võivad olla suuremad.

Uuritava kemikaali preparaati kandaines

16. Selleks et tagada uuritava kemikaali vajalik kontsentratsioon õhus ja osakeste suurus, võib olla vaja kasutada kandainet. Eelistatult tuleks kasutada vett. Aineosakesi võib töödelda mehaaniliselt, et saavutada osakeste soovitud suurusjaotus, kuid tuleks olla hoolikas, et uuritavat kemikaali mitte lagundada ega muuta. Kui mehaaniline töötlus (näiteks tugeval jahvatamisel hõõrdumisest tekkinud kõrge temperatuur) võib olla uuritava kemikaali koostist muutnud, siis tuleks uuritava kemikaali koostist analüüsiga kontrollida. Tuleks olla hoolikas, et vältida uuritava kemikaali saastamist. Ei ole vaja katsetada raskesti peenestuvat teralist materjali, mis on sihipäraselt valmistatud nii, et seda ei saa sisse hingata. Materjali hõõrumisega tuleks tõendada, et teralise materjali käsitsemisel ei teki sissehingatavaid osakesi. Kui hõõrumiskatsel tekib sissehingatavaid osakesi, tuleks teha sissehingamisel mürgisust näitav katse.

Loomade kontrollrühm

17. Samaaegne negatiivne (puhtas õhus peetavate) loomade kontrollrühm ei ole vajalik. Kui katsekeskkonna loomiseks kasutatakse muud kandainet kui vesi, siis tuleks kandaine kontrollrühma kasutada ainult juhul, kui varasemad sissehingamisel avalduva mürgisuse andmed ei ole kättesaadavad. Kui kandaines sisalduva uuritava kemikaali mürgisuse uuringuga mürgisust ei leita, siis võib järeldada, et kandaine ei ole katsetatud kontsentratsioonil mürgine, seega ei ole kandaine kontrollrühm vajalik.

KOKKUPUUTETINGIMUSTE SEIRE**Kambri õhuvarustus**

18. Igas kokkupuutekatses tuleks kambri õhuvarustust hoolikalt kontrollida, pidevalt seirata ning andmed vähemalt kord tunnis registreerida. Keskkonnas oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (või selle stabiilsuse) seire on kõigi dünaamiliste parameetrite mõõtmisel tingimata vajalik ja kujutab endast kaudset vahendit keskkonna tekitamise kõigi asjakohaste dünaamiliste parameetrite kontrollimiseks. Eraldi tuleks jälgida, et ainult nina kaudu kokkupuute uurimise kambri ei hingataks väljahingatud õhku uuesti sisse, kuna kokkupuutesüsteemi õhuvarustus ei ole piisav uuritavat kemikaali sisaldava õhu dünaamilise voo tagamiseks. On olemas meetodika, mille abil saab tõendada, et valitud katsetingimustes ei hingata väljahingatud õhku uuesti sisse (2, 11). Hapnikusisaldus peaks olema vähemalt 19 % ja süsinikdioksiidisaldus ei tohiks ületada 1 %. Kui on alust arvata, et kõnealuseid nõudeid ei ole võimalik täita, siis tuleks hapniku- ja süsinikdioksiidisaldust mõõta.

▼ **M4****Kambri temperatuur ja suhteline õhuniiskus**

19. Kambri temperatuuri tuleks hoida 22 ± 3 °C juures. Loomade hingamistsooni suhtelist õhuniiskust tuleks nii ainult nina kui ka kogu keha kaudu kokkupuute katsetes seirata ja registreerida vähemalt kolm korda kuni neljaltunnise katse jooksul ning iga tund lühema katse puhul. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuid uuritava kemikaali mõju tõttu (näiteks veepõhise segu uurimisel) ei pruugi see olla saavutatav või mõõdetav.

Uuritav kemikaal: nimikontsentratsioon

20. Kui see on võimalik, siis tuleks kokkupuutekambri nimikontsentratsioon alati arvutada ja registreerida. Nimikontsentratsioon on katsekeskkonda lisatud uuritava kemikaali mass, mis on jagatud läbi kambriüsteemi suunatud õhu kogumahuga. Nimikontsentratsiooni ei kasutata loomade kokkupuute iseloomustamiseks, kuid nimikontsentratsiooni võrdlus tegeliku kontsentratsiooniga näitab katsesüsteemi kemikaali lisamise tõhusust ning seega saab seda kasutada kemikaali lisamisel esinevate probleemide avastamiseks.

Uuritav kemikaal: tegelik kontsentratsioon

21. Tegelik kontsentratsioon on inhalatsioonikambri loomade hingamistsoonist võetud proovist määratud uuritava kemikaali kontsentratsioon. Tegelikke kontsentratsioone on võimalik määrata spetsiifiliste meetodite abil (näiteks otsene proovivõtt, adsorptsiooni- või keemilise reaktsiooni meetodid ning järgnev analüüsimine) või mittespetsiifiliste meetodite abil, näiteks filtrite gravimeetriline analüüs. Gravimeetrilise analüüsi kasutamine on lubatud ainult ühest koostisainest koosneva pulberaerosooli või vähelenduva vedeliku aerosooli korral ja see peaks olema enne katse tegemist kinnitatud konkreetse kemikaali määramisega. Mitmest koostisainest koosneva pulberaerosooli kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks võib samuti kasutada gravimeetrilist analüüsi. Sel juhul tuleb analüüsiga tõendada, et õhus oleva materjali koostis sarnaneb lähtematerjali koostisega. Kui selline teave ei ole kättesaadav, võib osutada vajalikuks teha uuringu vältel uuritava kemikaali (eelistatult lenduvas olekus) kordusanalüüsi korrapäraste ajavahemike järel. Aerosoolainete puhul, mis võivad aurustuda või sublimeeruda, tuleks näidata, et valitud meetodiga koguti kõiki faase. Katseprotokollis tuleks esitada siht-, nimi- ja tegelikud kontsentratsioonid, kuid letaalse kontsentratsiooni arvutamiseks kasutatakse statistilises analüüsis ainult tegelikke kontsentratsioone.
22. Võimaluse korral tuleks kasutada uuritava kemikaali ühte partiid ning uuritavat proovi tuleks säilitada tingimustes, milles säilib selle puhtus, homogeensus ja stabiilsus. Enne uuringu alustamist tuleks uuritavat kemikaali, sh selle puhtust, iseloomustada; kui see on tehniliselt võimalik, tuleb keemiliselt määratleda ka kindlakstehtud saasteained ja lisandid ning määrata nende kogused. Seda on võimalik tõendada muu hulgas järgmiste andmete alusel: retentsiooniaeg ja suhteline piigipindala, molekulmass massispektroskoopia või gaaskromatograafia analüüsidesid või muud hinnangud. Kuigi uurimislabor ei vastuta uuritava kemikaali proovi keemilise määramise eest, võib uurimislaboril olla mõttekas kinnitada tellija iseloomustust vähemalt piiratud ulatuses (näiteks värv, füüsikalised omadused jne).
23. Kokkupuutekeskkonda hoitakse võimaluste piires muutumatuna ja seiratakse pidevalt ja/või pisteliselt, olenevalt analüüsimeetodist. Kui kasutatakse pistelist proovivõttu, tuleks neljaltunnise uuringu vältel võtta kambrikeskkonnast proove vähemalt kaks korda. Kui see ei ole piiratud õhuvarustuse või väikeste kontsentratsioonide tõttu võimalik, võib kogu kokkupuuteperioodi kohta võtta ühe proovi. Kui proovide analüüsimisel saadakse oluliselt erinevad tulemused, tuleks järgmiste uuritavate kontsentratsioonide puhul

▼ **M4**

võtta kokkupuute kohta neli proovi. Kambrist võetud proovide üksikud kontsentratsioonid ei tohiks keskmisest kontsentratsioonist erineda rohkem kui $\pm 10\%$ gaaside ja aurude puhul või $\pm 20\%$ vedelik- või pulberaerosoolide korral. Tuleks arvutada kambri tasakaaluoleku saavutamise aeg (t_{95}) ja see registreerida. Kokkupuute kestus on aeg, mille vältel lisatakse uuritavat kemikaali ja seejuures arvestatakse t_{95} saavutamiseks vajalikku ajavahe- mikk. Juhendid t_{95} hindamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

24. Väga keeruka segu puhul, mis koosneb gaasidest/aurudest ja aerosoolidest (näiteks põlemiskeskonnad ja uuritavad kemikaalid, mida paiskab välja mõni eriotstarbeline lõppkasutustoode või -seade), võib iga faas käituda inhalatsioonikambri erinevalt, nii et tuleks valida vähemalt üks uuritav aine (mida analüüsiga määratakse), tavaliselt sellise segu peamine toimeaine, iga faasi (gaas/aur ja aerosool) kohta. Kui uuritav kemikaal on segu, siis tuleks kirja panna segu analüütiline kontsentratsioon ja mitte ainult toimeaine või komponendi (analüüsiga määratava aine) kontsentratsioon. Lisateave tegelike kontsentratsioonide kohta on juhenddokumendis nr 39 (2).

Uuritav kemikaal: osakeste suurusjaotus

25. Aerosooliosakeste suurusjaotus tuleks kindlaks määrata vähemalt kaks korda iga neljatunnise kokkupuute ajal, kasutades kaskaadimpaktorit või alternatiivset seadet, näiteks aerodünaamilist osakeste suuruse määrajat. Kui on võimalik tõendada kaskaadimpaktori ja alternatiivse seadme abil saadud tulemuste võrdväärsust, võib kogu uuringu tegemiseks kasutada alternatiivset seadet. Paralleelselt peamise seadmega tuleks kasutada teist seadet, näiteks gravimeetristilist filtrit või minitsüklonit või gaasipesukolbi, et veenduda peamise seadme kogumistõhususes. Osakeste suuruse analüüsi kaudu saadud massikontsentratsioon peaks mõistlikes piirides kokku langema filtrianalüüsi abil saadud massikontsentratsiooniga (vt juhenddokument nr 39 (2)). Kui uuringu varajases etapis on võimalik tõendada võrdväärsust, siis võib loobuda täiendavatest kinnitavatest mõõtmistest. Loomade heaolu silmas pidades tuleks võtta meetmeid, et mitte saada katsest ebaselgeid andmeid, mille tõttu võib olla vajalik kokkupuudet korrata. Aurudega tuleks teha osakeste suurusjaotuse määramine sel juhul, kui on võimalik, et auru kondensatsiooni tõttu võib tekkida aerosool või kui auru keskkonnas tuvas- tatakse osakesi, mille puhul võib tegemist olla faaside seguga (vt punkt 15).

KATSE KÄIK

26. Allpool on kirjeldatud kahte järgmist uuringutüüpi: tavaline määramiseeskiri ja $C \times t$ määramise eeskiri. Mõlemad eeskirjad võivad hõlmata eeluuringut, põhiuuringut ja/või piirsalduskatset (tavaline määramiseeskiri) või katseta- mist piirkontsentratsiooni juures ($C \times t$). Kui mõju on teadaolevalt suurem ühele soole, võib uuringu juht otsustada, et uuringus kasutatakse ainult tundlikuma soo isendeid. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasu- tatakse muu näriliseligi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Enne alustamist tuleks loomade kasutamise minimeerimiseks võtta arvesse kõik kättesaadavad andmed. Näiteks käesoleva lisa peatüki B.52 (4) kohaselt saadud andmed võivad muuta eeluuringu tarbetuks ja näidata, kas mõju sõltub looma soost (vt juhenddokument nr 39 (2)).

▼ **M4****TAVALINE MÄÄRAMISEESKIRI****Üldised põhimõtted: tavaline määramiseeskiri**

27. Tavalise uuringu puhul viiakse loomarühmad kokkupuutesse uuritava kemikaaliga kindla ajavahemiku jooksul (tavaliselt neli tundi) kas ainult nina kaudu kokkupuudet võimaldavas või kogukehakambris. Loomad viiakse kokkupuutesse kas piirkontsentratsiooniga (piirsalduskatse) või vähemalt kolme kontsentratsiooniga astmelises protseduuris (põhiuuring). Põhiuuringule võib eelneda eeluuring, v.a juhul, kui uuritava kemikaali kohta on mingil määral teavet juba olemas, näiteks eelnevalt tehtud uuring B.52 (vt juhenddokument nr 39 (2)).

Eeluuring: tavaline määramiseeskiri

28. Eeluuringut kasutatakse uuritava kemikaali mõju prognoosimiseks, mõju sooliste erinevuste kindlaksmääramiseks ning põhiuuringu või piirsalduskatse jaoks kokkupuute kontsentratsioonide valimisel abistamiseks. Eeluuringu kontsentratsioonide valimisel tuleks kasutada kogu kättesaadavat teavet, sh olemasolevaid (kvantitatiivse) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuse ((Q)SAR) andmeid ja andmeid samalaadsete kemikaalide kohta. Iga kontsentratsiooniga ei tohiks puutuda kokku rohkem kui kolm isast ja kolm emast isendit (soolise erinevuse kindlaksmääramiseks võidakse vajada kolme looma kummagi soo kohta). Eeluuringus võib kasutada ühte kontsentratsiooni, aga vajaduse korral võib kasutada ka rohkem kui ühte kontsentratsiooni. Eeluuringus ei tuleks katsetada nii palju loomi ja kontsentratsioone, et see sarnaneks juba põhiuuringuga. Eeluuringu asemel võib kasutada varem tehtud uuringut B.52 (4) (vt juhenddokument nr 39 (2)).

Piirsalduskatse: tavaline määramiseeskiri

29. Piirsalduskatset kasutatakse, kui uuritav kemikaal ei ole teadaolevalt või eeldatavalt mürgine, s.o mürgistus tekib ainult regulatiivse piirkontsentratsiooni ületamise puhul. Piirsalduskatse viiakse uuritava kemikaaliga piirkontsentratsiooni juures kokkupuutesse üks kolmest isasest ja kolmest emasest koosnev loomarühm. Teavet uuritava kemikaali mürgisuse kohta võib saada varem katsetatud samalaadseid kemikaale käsitlevatest andmetest, võttes arvesse toksikoloogiliselt oluliste koostisainete keemilist laadi ja sisaldust. Kui teavet mürgisuse kohta on vähe või ei ole üldse või kui uuritav kemikaal on eeldatavasti mürgine, tuleks sooritada põhikatse.
30. Piirkontsentratsiooni valimine sõltub tavaliselt regulatiivsetest nõuetest. Kui kohaldatakse määrust (EÜ) nr 1272/2008, on gaasi, auru ja aerosooli piirkontsentratsioon vastavalt 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l (või suurim saavutatav kontsentratsioon) (3). Mõne uuritava kemikaali, eelkõige auru või aerosooli piirkontsentratsiooni saavutamine võib olla tehniliselt keeruline. Aerosooli katsetamisel peaks olema peamine eesmärk saavutada sissehingamiseks sobiv osakeste suurus (MMAD 1–4 µm). See on enamiku uuritavate kemikaalide puhul võimalik kontsentratsioonil 2 mg/l. Aerosooli katsetamist rohkem kui 2 mg/l juures tuleks proovida ainult juhul, kui on võimalik saavutada sissehingamiseks sobiv osakeste suurus (vt juhenddokument nr 39 (2)). Määruses (EÜ) nr 1272/2008 ei soovitata loomade heaolu kaalustel kasutada katse piirkontsentratsiooni ületavat kontsentratsiooni (3). Piirkontsentratsiooni kasutamist tuleks kaaluda ainult siis, kui on suur tõenäosus, et kõnealuse katse tulemustest võib otseselt sõltuda inimeste tervise kaitse (3), ja seda tuleks katseprotokollis põhjendada. Plahvatusohtliku uuritava kemikaali puhul tuleks olla hoolikas, et vältida plahvatust võimaldavaid tingimusi. Loomade tarbetu kasutamise vältimiseks tuleks enne piirsalduskatset teha proovikatse ilma loomadeta, et tagada piirsalduskatse jaoks vajalike kambritingimuste saavutamine.

▼ **M4**

31. Kui piirkontsentratsiooni juures täheldatakse, et loomad surevad või on suremas, siis võib piirsalduskatse tulemusi kasutada eeluuringuna muudel kontsentratsioonidel edasiseks katsetamiseks (vt põhiuuring). Kui uuritava kemikaali füüsikalised või keemilised omadused muudavad piirkontsentratsiooni saavutamise võimatuks, siis tuleks katsetada suurimat saavutatavat kontsentratsiooni. Kui suurim saavutatav kontsentratsioon põhjustab alla 50 % suremuse, siis ei ole edasine katsetamine vajalik. Kui piirkontsentratsiooni ei ole võimalik saavutada, siis tuleks katseprotokollis esitada selgitus ja täiendavad andmed. Kui auruga saavutatav suurim kontsentratsioon ei ole mürGINE, siis võib olla vajalik lisada uuritavat kemikaali vedelikaerosoolina.

Põhiuuring: tavaline määramiseeskiri

32. Põhiuuring tehakse tavaliselt vähemalt kolme kontsentratsiooniga, kasutades viit isas- ja viit emaslooma (või kui on teada, kummast soost isendid on tundlikumad, siis viit sellest soost looma) igal kontsentratsioonil. Usaldusväärse statistilise analüüsi tagamiseks tuleks kasutada piisavalt suuri kontsentratsioone. Ajavahemik katserühmade kokkupuutekatsete vahel määratakse kindlaks mürgistusnähtude alguse, kestuse ja raskuse järgi. Loomade kokkupuude järgmise kontsentratsiooniga tuleks edasi lükata seni, kuni eelmises katses kasutatud loomade ellujäämises võib olla mõistlikkuse piires veendunud. See võimaldab uuringu juhul kohandada järgmise kokkupuuterühma sihtkontsentratsiooni. Kuna katses kasutatakse keerukat tehnoloogiat, ei pruugi see inhalatsiooniuuringute puhul alati olla praktiline. Sellisel juhul peaks loomade kokkupuude järgmise kontsentratsiooniga põhinema varasemal kogemusel ja teaduslikul hinnangul. Segu katsetamisel tuleks tugineda juhenddokumendile nr 39 (2).

C × T (KONTSENTRATSIOON × AEG) MÄÄRAMISE EESKIRI**Üldised põhimõtted: C × t määramise eeskiri**

33. Sissehingamisel avalduva mürgisuse hindamisel võidakse tavalise määramiseeskirja alternatiivina kaaluda astmelist C × t määramise eeskirja (12, 13, 14). Selle lähenemisviisi puhul võivad loomad puutuda uuritava kemikaaliga kokku mitmel kontsentratsioonil ja mitme ajavahemiku vältel. Kõik katsed tehakse ainult nina kaudu kokkupuudet võimaldavas kambris (kogukehakambrid ei ole selle määramiseeskirja jaoks praktilised). Seda eeskirja on kirjeldatud 1. liite toimimisskeemiga. Simulatsioonianalüüsiga on näidatud, et tavaline määramiseeskiri ja C × t määramise eeskiri võivad mõlemad anda kindlaid LC₅₀ väärtusi, kuid C × t määramise eeskiri annab tavaliselt kindlamaid LC₀₁ ja LC₁₀ väärtusi (15).
34. Simulatsioonianalüüs on näidanud, et C × t intervalli kohta kahe looma kasutamine (üks loom kummastki soost mõlema soo kasutamise korral või kaks looma sellest soost, kummale on suurem mõju) võib tavaliselt olla piisav põhiuuringus nelja kontsentratsiooni ja viie kokkupuute ajavahemiku katsetamise korral. Mõnel juhul võib uuringu juht otsustada kasutada kummagi soo puhul kahte rotti C × t intervalli kohta (15). Kummastki soost kahe looma kasutamine kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta võib vähendada andmete kallutatust ja hinnangute hajumist, suurendada ennustuste täpsust ja hälvete kirjeldatavust usaldusvahemikuga. Kui andmete kooskõla ei ole hindamiseks piisav (kui kasutatakse ühte looma kummastki soost või kahte looma soost, millele on suurem mõju), siis võib piisata viienda kokkupuutekontsentratsiooni kasutamisest. Täiendavad juhendid C × t uuringus kasutatavate loomade arvu ja kontsentratsioonide kohta on juhenddokumendis nr 39 (2).

▼ **M4****Eeluring: $C \times t$ määramise eeskiri**

35. Uuritava kemikaali mõju hindamiseks ja põhiuuringu kokkupuutekontsentratsioonide valimiseks kasutatakse eeluringut. Vajalik võib olla eeluring, milles kasutatakse kuni kolme looma soo ja kontsentratsiooni kohta (vt lähemalt juhenddokumendi nr 39 (2) III liide), et valida põhiuuringu jaoks sobiv algkontsentratsioon ja minimeerida kasutatavate loomade arvu. Soolise erinevuse kindlaksmääramiseks võib olla vajalik kasutada kolme looma soo kohta. Need loomad peaksid puutuma ainega kokku katse ühe ajavahemiku jooksul, tavaliselt 240 minutit. Asjakohaste katsekeskkondade loomise võimalikkust tuleks hinnata ilma loomadeta tehtavate tehniliste proovikatsete ajal. Eeluringu tegemine ei ole tavaliselt vajalik, kui suremuse andmed on kättesaadavad B.52 kohasest uuringust (4). B.2 kohase uuringu lähtesihtkontsentratsiooni valides peaks uuringu juht arvesse võtma kõiki olemasolevaid B.52 kohastes uuringutes (4) mõlema soo ja kõigi katsetatud kontsentratsioonide kohta saadud suremuse andmeid (vt juhenddokument nr 39 (2)).

Lähtekontsentratsioon: $C \times t$ määramise eeskiri

36. Lähtekontsentratsioon (I kokkupuude) (1. liide) on kas piirkontsentratsioon või uuringu juhi poolt eeluringu alusel valitud kontsentratsioon. Kahest loomast (üks kummagi soo kohta) koosnevad rühmad viiakse kokkupuutesse kõnealuse kontsentratsiooniga mitme ajavahemiku vältel (näiteks 15, 30, 60, 120 või 240 minutit), mis teeb kokku kümme looma (I kokkupuude) (1. liide).
37. Piirkontsentratsiooni valimine sõltub tavaliselt regulatiivsetest nõuetest. Kui kohaldatakse määrust (EÜ) nr 1272/2008, on gaaside, aurude ja aerosoolide piirkontsentratsioonid vastavalt 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l (või suurim saavutatav kontsentratsioon) (3). Mõne uuritava kemikaali, eelkõige auru või aerosooli piirkontsentratsiooni tekitamine võib olla tehniliselt keeruline. Aerosooli katsetamisel peaks eesmärk olema saavutada sissehingamiseks sobiv osakeste suurus (st MMAD 1–4 μm) piirkontsentratsioonil 2 mg/l. See on enamiku uuritavate kemikaalide puhul võimalik. Aerosooli katsetamist rohkem kui 2 mg/l juures tuleks proovida ainult juhul, kui sissehingamiseks sobiv osakeste suurus on võimalik saavutada (vt juhenddokument nr 39 (2)). Määruses (EÜ) nr 1272/2008 ei soovitata loomade heaolu kaalutlustel piirkontsentratsiooni ületava kontsentratsiooniga katsetamist (3). Piirkontsentratsiooni ületava kontsentratsiooni katsetamist tuleks kaaluda ainult juhul, kui on suur tõenäosus, et kõnealuse katse tulemustel on otsene mõju inimeste tervise kaitsele (3), ja katseprotokollis tuleks seda põhjendada. Plahvatusohtliku uuritava kemikaali puhul tuleks olla hoolikas, et vältida plahvatust võimaldavaid tingimusi. Loomade ebavajaliku kasutamise vältimiseks tuleks enne katset lähtekontsentratsiooniga teha proovikatse ilma loomadeta, et tagada kõnealuse kontsentratsiooni jaoks vajalike kambritingimuste saavutatavus.
38. Kui lähtekontsentratsiooni juures täheldatakse, et loomad surevad või on suremas, võib kõnealuse kontsentratsiooniga saadud tulemusi kasutada lähtepunktina edasiseks katsetamiseks muude kontsentratsioonidega (vt põhiuuring). Kui uuritava kemikaali füüsikalised või keemilised omadused muudavad piirkontsentratsiooni saavutamise võimatuks, tuleks katsetada suurimat saavutatavat kontsentratsiooni. Kui suurim saavutatav kontsentratsioon põhjustab alla 50 % suremuse, ei ole edasine katsetamine vajalik. Kui piirkontsentratsiooni ei ole võimalik saavutada, tuleks katseprotokollis esitada selgitus ja seda toetavad andmed. Kui auru suurim saavutatav kontsentratsioon ei ole mürgine, siis võib olla vajalik lisada uuritavat kemikaali vedelikaerosoolina.

▼ **M4****Põhiuuring: $C \times t$ määramise eeskiri**

39. Põhiuuringus katsetatav lähtekontsentratsioon (I kokkupuude) (1. liide) on kas piirkontsentratsioon või uuringu juhi poolt eeluuringu alusel valitud kontsentratsioon. Kui I kokkupuute ajal või selle järel täheldatakse loomade suremist, võetakse suremist põhjustav minimaalne kokkupuude ($C \times t$) aluseks II kokkupuute kontsentratsiooni ja ajavahemike kindlaksmääramisel. Iga edasine kokkupuude oleneb eelnevast kokkupuutest (vt 1. liide).
40. Paljude uuritavate kemikaalide puhul on lähtekontsentratsiooniga saadud tulemused koos kolme lühema täiendava kokkupuutega (kokkupuute ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille järjestikuste ajavahemike erinevus näitab progressiooni kordaja, tavaliselt $\sqrt{2}$) piisav $C \times t$ suremuse suhte kindlaksmääramiseks (15), kuid otstarbekas võib olla viienda kokkupuutekontsentratsiooni kasutamine (vt 1. liide ja juhenddokument nr 39 (2)). $C \times t$ protokollile tulemuste matemaatiline käsitus on esitatud 1. liites.

VAATLUSED

41. Loomi tuleks kokkupuute ajal sageli kliiniliselt jälgida. Pärast kokkupuudet tuleks kliinilised vaatlused korraldada vähemalt kaks korda kokkupuutepäeva jooksul või, kui loomade reageerimine kokkupuutele seda nõuab, ka sagedamini, ja seejärel vähemalt kord päevas kokku 14 päeva jooksul. Vaatlemise ajavahemiku kestus ei ole kindlaks määratud; see tuleks määrata kliiniliste nähtude laadi, tekkimisaja ja taastumisperioodi pikkuse alusel. Mürgistusnähtude ilmumise ja kadumise aeg on oluline eelkõige juhul, kui mürgistusnähtudel on kalduvus avalduda viitmõjuna. Kõik vaatlused registreeritakse süstemaatiliselt, säilitades iga looma kohta eraldi andmed. Suremas olevad loomad ja loomad, kellel esinevad tugeva valu ja/või püsivad suurte kannatuste tunnused, tuleks loomade heaolu kaalutlustel humaansel viisil surmata. Mürgistuse kliiniliste nähtude vaatluste tegemisel tuleks olla hoolikas, et mitte pidada kokkupuutekatsetest põhjustatud esialgset kehva välimust ja ajutisi hingamismuutusi uuritava kemikaaliga seotud mürgistuseks, mis nõuaks loomade enneaegset surmamist. Tuleks võtta arvesse humaansete lõpetamiskriteeriumide juhenddokumendis (nr 19) esitatud põhimõtteid ja kriteeriume (7). Kui loomad surmataks humaansel kaalutlustel või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.
42. Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade ja limaskestade, hingamise, vereringe- ning autonoomse ja tsentraalse närvisüsteemi muutusi, somatomotoorset aktiivsust ja käitumismustrit. Võimaluse korral tuleks eristada lokaalset ja süsteemset mõju ja need registreerida. Tuleb pöörata tähelepanu värinate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma esinemisele. Pärakutemperatuuri mõõtmine võib anda lisaandmeid refleksipõhise hingamise aeglustumise või hüpo-/hüpertermia kohta, mis on seotud kokkupuute või vangistusega.

Kehamass

43. Iga looma kehamass tuleks registreerida üks kord kohanemise perioodi vältel, kokkupuute päeval enne kokkupuudet (päev 0) ning vähemalt päevadel 1, 3 ja 7 (ning seejärel iga nädal) ja surma või eutanaasia korral, kui see toimub pärast päeva 1. Kehamass on teatavasti mürgistuse oluline näitaja ja seega tuleks täpselt jälgida loomi, kelle kehamass väheneb püsivalt $\geq 20\%$ võrreldes uuringueelsete näitajatega. Ellujäänud loomad kaalutakse ja surmataks humaansel viisil kokkupuutejärgsel ajavahemikul.

▼ M4**Patoloogia**

44. Kõik katseloomad (kaasa arvatud need, kes surid katse käigus või kes surmati eutanaasiaga või kõrvaldatakse uuringust loomade heaolu tagamiseks) lahatakse täielikult. Kui lahkamine vahetult pärast surnud looma leidmist ei ole võimalik, tuleks loom jahutada (mitte külmutada) autolüüsi minimeerimiseks piisavalt madala temperatuurini. Lahata tuleks võimalikult kiiresti, tavaliselt ühe või kahe päeva jooksul. Iga looma kõik üldpatoloogilised muutused tuleks registreerida, pöörates eritähelepanu hingamisteede mis tahes muutustele.
45. Uuringu tõlgendusväärtuse laiendamiseks võidakse kaaluda kavandis eelnevalt ette nähtud täiendavaid uuringuid, näiteks ellujäänud rottide kopsude massi mõõtmine ja/või hingamisteede ärrituse tõendamine hingamisteede mikroskoobiga vaatlemise alusel. Uurida võib ka organeid, milles 24 tundi või kauem elanud loomadel esineb patoloogilisi muutusi, samuti organeid, mis teadaolevalt või eeldatavasti võivad olla kahjustatud. Kogu hingamisteede mikroskoobiuuring võib anda kasulikku teavet veega reageeriva uuritava kemikaali, näiteks happe või hügrokoopse kemikaali kohta.

ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmed**

46. Tuleks esitada andmed iga üksiku looma kehamassi ja lahkamistulemuste kohta. Kliiniliste vaatluste andmed tuleks esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates iga katserühma puhul ära osalenud loomade arvu, konkreetsete mürgistusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnuna leitud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahanguleiud.

Katseprotokoll

47. Katseprotokoll peaks sisaldama võimaluse korral järgmist teavet.

Katseloomad ja pidamistingimused

— Puuritingimuste kirjeldus, sh: loomade arv (või arvu muutus) puuri kohta, allapanu, õhu temperatuur ja suhteline niiskus, valgustusperiood ja sööt.

— Kasutatud liik/liin ja muu liigi kui roti kasutamise põhjendus.

— Loomade arv, vanus ja sugu.

— Randomiseerimismeetod.

— Sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/päritolu, vee päritolu).

— Kõigi eelnenud ettevalmistamismeetmete kirjeldus, sh söötmine, karantiin ja haiguste ravi.

▼ **M4***Uuritav kemikaal*

- Füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerne koostis).
- Identifitseerimisandmed, Chemical Abstract Services Registry ehk CASi nr, kui see on teada.

Kandeaine

- Kandeaine kasutamise põhjendus ja valiku põhjendus (kui kandeainena ei kasutata vett).
- Varasemad või rööpandmed, millega tõendatakse, et kandeaine ei mõjuta uuringu tulemusi.

Inhalatsioonikamber

- Inhalatsioonikambri, sh selle mõõtmete ja mahu kirjeldus.
- Loomade kokkupuute jaoks kasutatavate seadmete päritolu ja kirjeldus ning samuti keskkonna tekitamise kirjeldus.
- Temperatuuri, niiskuse, osakeste suuruse ja tegeliku kontsentratsiooni mõõtmise seadmed.
- Õhuallikas ja kambri suunatud / kambri välja lastud õhu töötlemine ning konditsioneerimiseks kasutatav süsteem.
- Homogeense katsekeskkonna tagamise seadmete kaliibrimisel kasutatud meetodid.
- Rõhuerinevus (positiivne või negatiivne).
- Kokkupuuteportide arv kambri kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude); loomade paiknemine süsteemis (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).
- Katsekeskkonna ajaline homogeensus/stabiilsus.
- Temperatuuri- ja niiskusandurite paigutus ning katsekeskkonnast proovide võtmine kambri.
- Õhuvoolu kiirused, õhuvoolu kiirus kokkupuuteportide kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude) või loomade hulk kambri kohta (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).
- Teave hapniku ja süsinikdioksiidi sisalduse mõõtmiseks kasutatud seadmete kohta, vajaduse korral.
- Inhalatsioonikambri tasakaaluseisundini jõudmiseks vajalik aeg (t_{95}).
- Kogu kambri oleva õhu vahetuste arv tunnis.
- Mõõteseadmed (vajaduse korral).

Andmed kokkupuute kohta

- Põhiuuringu sihtkontsentratsiooni valimise põhjendus.
- Nimikontsentratsioonid (inhalatsioonikambri suunatud uuritava kemikaali kogumass, mis on jagatud läbi kambri juhitud õhu kogusega).
- Uuritava kemikaali tegelikud kontsentratsioonid loomade hingamistsooni kogutud proovides; heterogeensel füüsilisel kujul esineva segu (gaas, aur, aerosool) puhul võidakse iga faasi eraldi analüüsida.

▼M4

- Kõik õhukontsentratsioonid tuleks teatada massiühikutes (näiteks mg/l, mg/m³ jne); sulgudes võib lisada ka ruumalaühikud (näiteks ppm, ppb jne).
- Osakeste suurusjaotus, massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) ja geomeetiline standardhälve (σ_g) ning nende arvutamise meetodid. Tuleks teatada üksikosakeste suuruse analüüsid.

Katsetingimused

- Üksikasjalikud andmed uuritava kemikaali ettevalmistamise kohta, sh andmed mis tahes meetmete kohta, mida kasutati tahke aine osakeste suuruse vähendamiseks või uuritava kemikaali lahuste valmistamiseks. Kui mehaanilised protsessid võivad olla muutnud uuritava kemikaali koostist, tuleb lisada nende analüüside tulemused, mille abil kontrolliti uuritava kemikaali koostist.
- Katsekeskkonna tekitamiseks ja loomade kokkupuuteks katsekeskkonnaga kasutatud seadmete kirjeldus (eelistatult koos joonisega).
- Andmed kasutatud keemilise analüüsi meetodi kohta ja meetodi valideerimise kohta (sh uuritava kemikaali analüütiline saagis proovivõtukeskkonna analüüsil).
- Katsekonsentratsioonide valiku põhjendus.

Tulemused

- Tabelid katsekambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoolu kohta.
- Tabelid kambri nimi- ja tegeliku kontsentratsiooni andmete kohta.
- Tabelid osakeste suurusjaotuse kohta, sh analüüsiproovide võtmise andmed, osakeste suurusjaotus ning MMAD ja σ_g arvutamine.
- Tabelid iga looma reageerimise ja kontsentratsioonide kohta (st mürgistusnähtudega loomad, kaasa arvatud surnud loomad, mõjude laad, raskus, ilmumise aeg ja mõju kestus).
- Uuringul registreeritud konkreetse looma kehamass; surmakuupäev ja -aeg, kui loom sureb enne plaanijärgset eutanaasiat, mürgistusnähtude tekke aeg ja pöördumus konkreetse looma puhul.
- Iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.
- Suremuse hinnangud (näiteks LC₅₀, LD₀₁), sh 95 % usalduspiirid ja kõvera tõus (kui see hindamismeetodi alusel esitatakse).
- Statistiline seos, sh eksponendi n hinnang ($C \times t$ määramise eeskiri). Tuleks esitada kasutatud statistikatarkvara nimetus.

▼ **M4***Tulemuste arutelu ja tõlgendamine*

- Eritähelepanu tuleks pöörata nende meetodite kirjeldamisele, mida kasutati käesoleva katsemeetodi kriteeriumide täitmiseks, näiteks piirkontsentratsioon või osakeste suurus.
- Üldtulemuste alusel tuleks käsitleda osakeste sissehingamiseks sobivat suurus, eelkõige siis, kui osakeste suuruse kriteeriume ei olnud võimalik täita.
- Kui OECD humaansete lõpetamiskriteeriumide juhenddokumendis (8) sätestatud kriteeriumide alusel tekkis vajadus humaansel viisil surmata valu kannatavaid või tõsiste ja püsivate kannatuste tunnustega loomi, siis tuleks esitada selgitus.
- Kui katsetamine käesoleva lisa peatüki B.52 (4) alusel katkestati käesoleva katsemeetodi B.2 rakendamiseks, siis tuleks seda põhjendada.
- Uuringu üldhinnangus tuleks käsitleda nimi- ja tegelike kontsentratsioonide kindlaksmääramiseks kasutatud meetodite kooskõllalisust ning tegeliku ja nimikontsentratsiooni vahelist seost.
- Tuleks käsitleda tõenäolist surma põhjust ja uuritava kemikaali peamist toimeviisi (süsteemne või lokaalne).

KIRJANDUS

- 1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- 2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- 3) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).
- 4) Käesoleva lisa peatükk B.52 „Äge mürgisus sissehingamisel – ägeda mürgisuse klassi määramise meetod”.
- 5) Käesoleva lisa peatükk B.40 „Nahasöövituskatse *in vitro*: transkutaanse elektritakistuse (TER) mõõtmine”.
- 6) Käesoleva lisa peatükk B.40a „Nahasöövituskatse *in vitro*: katse inimnaha mudeliga”.
- 7) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- 8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil <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 RF (2009). *Inhalation Studies: Foundations and Techniques*. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.

▼M4

- 11) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160–167.
- 12) Zwart JHE, Arts JM, ten Berge WF, Appelman LM (1992). Alternative Acute Inhalation Toxicity Testing by Determination of the Concentration-Time-Mortality Relationship: Experimental Comparison with Standard LC50 Testing. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 15: 278–290.
- 13) Zwart JHE, Arts JM, Klokman-Houweling ED, Schoen ED (1990). Determination of Concentration-Time-Mortality Relationships to Replace LC50 Values. *Inhal. Toxicol.* 2: 105–117.
- 14) Ten Berge WF and Zwart A (1989). More Efficient Use of Animals in Acute Inhalation Toxicity Testing. *J. Haz. Mat.* 21: 65–71.
- 15) OECD (2009). Performance Assessment: Comparison of 403 and $C \times t$ Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Kättesaadav aadressil <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- 16) Finney DJ (1977). *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

MÕISTE

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse/uuriti käesoleva katsemetodi abil.

▼ **M4***1. liide***C × t määramise eeskiri**

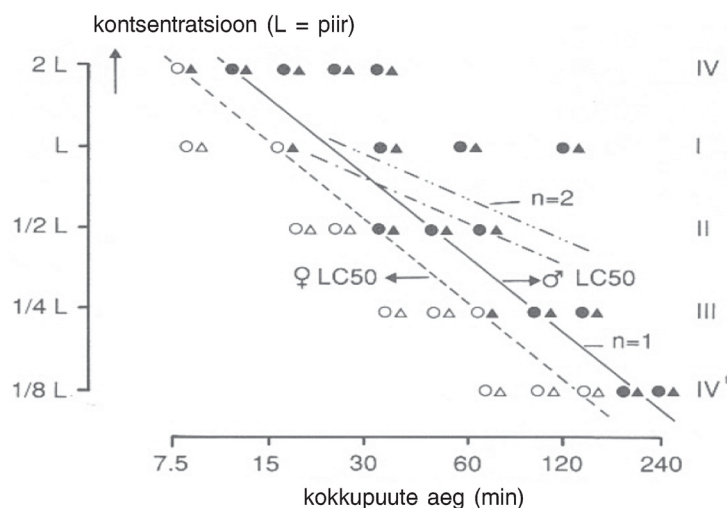
1. Sissehingamisel avalduva mürgisuse hindamisel võib tavalise määramiseeskirja alternatiivina kaaluda astmelist C × t (kontsentratsioon × aeg) määramise eeskirja (12, 13, 14). Seda tuleks kasutada eelistatavalt juhul, kui konkreetne regulatiivne või teaduslik vajadus nõuab loomade katsetamist mitme ajavahemiku vältel, näiteks hädaolukorrale reageerimise või maakasutuse kavandamiseks. Sel juhul alustatakse tavaliselt piirkontsentratsioonil katsetamisest (I kokkupuude), mille puhul loomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga viie ajavahemiku jooksul (näiteks 15, 30, 60, 120 ja 240 min), nii et ühe kokkupuute ajal püütakse saada andmed mitme ajavahemiku kohta (vt joonis 1). Kui kohaldatakse määrust (EÜ) nr 1272/2008, on gaasi, auru ja aerosooli piirkontsentratsioon vastavalt 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l. Neid tasemeid võib ületada ainult juhul, kui kõnealustel tasemetel katsetamiseks on regulatiivne või teaduslik vajadus (vt B.2 põhitteksti punkt 37).
2. Kui uuritava kemikaali mürgisuse kohta on vähe teavet või seda ei ole üldse, tuleks teha eeluuring, mille vältel loomarühmad, milles on kuni kolm looma kummastki soost, viiakse tavaliselt 240 minuti vältel kokkupuutesse uuringu juhi valitud sihtkontsentratsiooniga.
3. Kui I kokkupuute ajal katsetatakse piirkontsentratsiooni ja täheldatakse suremust alla 50 %, ei ole täiendav katsetamine vajalik. Kui on regulatiivne või teaduslik vajadus määrata kontsentratsiooni/aja/mõju vaheline seos piirkontsentratsioonist suuremal kontsentratsioonil, tuleks järgmine kokkupuude teha kõrgema tasemega, näiteks piirkontsentratsioonist kaks korda suurema kontsentratsiooniga (s.o 2L joonisel 1).
4. Kui piirkontsentratsiooni juures täheldatakse mürgisust, on vaja teha täiendav uuring (põhiuuring). Kõnealused täiendavad kokkupuuted tehakse kas väiksema kontsentratsiooniga (joonisel 1: II, III või IV' kokkupuude) või suurema kontsentratsiooniga, kasutades lühemaid ajavahemikke (joonisel 1: IV kokkupuude), mis on kohandatud ja mille vahed ei ole nii suured.
5. Katse (esialgne kontsentratsioon ja täiendavad kontsentratsioonid) tehakse, kasutades iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta kas ühte looma kummastki soost või kahte looma sellest soost, kumb on tundlikum. Mõnel juhul võib uuringu juht otsustada, et iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta kasutatakse kahte rotti kummastki soost (või nelja looma tundlikumast soost) (15). Kui kirjeldatud määramiseeskirja puhul kasutatakse iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta kahte looma kummastki soost, väheneb tavaliselt andmete kallutatus ja hinnangute muutlikkus, suureneb hinnangute täpsus ja paraneb hälvete kirjeldatavus usaldusvahemikuga. Täpsemad üksikasjad on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).
6. Ideaaljuhul tehakse iga kokkupuude ühel päeval. See võimaldab viivitada järgmise kokkupuutega, kuni võib olla mõistlikult kindel, et loomad jäävad ellu, ja see võimaldab uuringu juhil kohandada järgmise kokkupuute jaoks sihtkontsentratsiooni ja ajavahemikku. Iga kokkupuudet soovitatakse alustada rühmaga, kelle kokkupuute kestus on kõige pikem, näiteks 240-minutilise kokkupuutega rühm, seejärel 120-minutilise kokkupuutega rühm jne. Kui näiteks loomad 240 minuti rühmas 90 minuti möödudes surevad või neil täheldatakse raske mürgistuse nähte (näiteks hingamisrütmi äärmuslikud muutused, nagu raske hingamine), ei ole mõistlik rühmale 120 minuti pikkust kokkupuudet korraldada, kuna suremus oleks tõenäoliselt 100 %. Seega peaks uuringu juht valima kõnealuse kontsentratsiooni jaoks lühemad kokkupuute ajavahemikud (näiteks 90, 65, 45, 33 ja 25 minutit).

▼ **M4**

7. Kambrikontsentratsiooni tuleks mõõta sageli, et määrata kindlaks ajaga kaalutud keskmine kontsentratsioon kokkupuute iga ajavahemiku kohta. Alati kui on võimalik, tuleks statistilise analüüsi jaoks kasutada iga looma surmaaega (kokkupuute kestuse asemel).
8. Esimese nelja kokkupuute tulemusi tuleks uurida, et määrata kindlaks kontsentratsiooni ja aja kõvera andmelüngad (vt joonis 1). Kui kooskõla ei ole piisav, võib korraldada täiendava kokkupuute (5. kontsentratsioon). 5. kokkupuutekontsentratsioon ja ajavahemikud tuleks valida nii, et kõrvaldatakse kõnealune andmelünk.
9. Kõiki kokkupuuteid (sh esimest kokkupuudet) kasutatakse statistilise analüüsi alusel kontsentratsiooni, aja ja mõju vahelise seose arvutamiseks (16). Kui see on iga $C \times t$ intervalli puhul võimalik, siis tuleks kasutada ajaga kaalutud keskmist kontsentratsiooni ja kokkupuute kestust surmani (kui loom sureb kokkupuute ajal).

Joonis 1

Hüpoteetiline joonis kontsentratsiooni, aja ja suremuse vahelise seose kohta rottidel



Valged sümbolid = ellujäänud; mustad sümbolid = surnud loomad

Kolmnurgad = emased; ringid = isased

Katkematu joon = LC_{50} väärtused (vahemik 7,5–240 min) kõigi $n = 1$ isaste puhul

Katkendjoon = LC_{50} väärtused (vahemik 7,5–240 min) kõigi $n = 1$ emaste puhul

Punktiirjooned = hüpoteetilised LC_{50} väärtused isaste ja emaste puhul, kui n oleks olnud 2 (12).

Mõisted

kontsentratsioon

kokkupuute aeg

piir

▼ **M4**

10. Allpool on esitatud astmelise toimumiskäigu näide.

I kokkupuude. Katse piirkontsentratsioonil (vt joonis 1)

- Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma ^(a)
- Sihtkontsentratsioon ^(b) = piirkontsentratsioon.
- Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga kõnealusel sihtkontsentratsioonil vastavalt 15, 30, 60, 120 ja 240 minutiks.



II kokkupuude ^(c). Põhiuuring

- Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma.
- Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga väiksemal kontsentratsioonil ^(d) (1/2L) mõnevõrra pikemateks kokkupuute ajavahemikeks (ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on $\sqrt{2}$; vt joonis 1).



III kokkupuude. Põhiuuring

- Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma.
- Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga väiksemal kontsentratsioonil ^(d) (1/4L) mõnevõrra pikemateks kokkupuute ajavahemikeks (ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on $\sqrt{2}$; vt joonis 1).



IV³ kokkupuude. Põhiuuring

- Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma.
- Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga väiksemal kontsentratsioonil ^(d) (1/8L) mõnevõrra pikemateks kokkupuute ajavahemikeks (ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on $\sqrt{2}$; vt joonis 1).



^(a) Kui soost sõltuva tundlikkuse andmeid ei ole, kasutatakse kummastki soost rotte, st üks loom kummastki soost iga kontsentratsiooni kohta. Olemasoleva teabe alusel või kui kõnealuse kokkupuute vältel selgub, et üks sugu on tundlikum, kasutatakse edasistes katsetes iga kontsentratsiooni kohta 10 tundlikumast soost looma (kaks looma iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta).

^(b) Kui kohaldatakse määrust (EÜ) nr 1272/2008, siis on gaasi, auru ja aerosooli piirkontsentratsioon vastavalt 20 000 ppm, 20 mg/l ja 5 mg/l. Kui eeldatakse mürgisust või kui mürgisus on tuvastatud eeluuringu, tuleks valida väiksem lähtekontsentratsioon. Regulaatiivse või teadusliku vajaduse korral võib kasutada suuremat kontsentratsiooni.

^(c) Ideaaljuhul tuleks loomade kokkupuude järgmisel kontsentratsioonil edasi lükata seni, kuni eelnevalt töödeldud loomade ellujäämises on mõistlikkuse piires veendunud. See võimaldab uuringu juhul kohandada järgmise kokkupuute sihtkontsentratsiooni ja ajavahemikke.

^(d) Minimaalne doos (kontsentratsioon \times aeg), mis põhjustas esialgsel kontsentratsioonil katsetamise ajal surma (esimene kokkupuude), võetakse aluseks kontsentratsiooni ja kokkupuute ajavahemiku järgmise kombinatsiooni kindlaksmääramisel. Tavaliselt vähendatakse kontsentratsiooni kaks korda (1/2L) ja loomade kokkupuude kemikaalidega toimub uute väiksemate vahedega ajavahemike vältel. Kokkupuute ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on 1,4 ($\sqrt{2}$; vt viide 11) ja mille keskel on see aeg, kus esimese kokkupuute raames leiti minimaalne letaalne doos (aeg \times kontsentratsioon). Kõnealusel joonisel (joonis 1) täheldati surma I kokkupuute vältel esmakordselt 15 minuti möödumisel; II kokkupuute ajavahemike keskel on seega 30 minutit ja ajavahemikud on 15, 21, 30, 42 ja 60 min. Pärast esimest kahte kokkupuudet on väga soovitatav koostada andmete alusel eespool näidatuga samalaadne joonis ning kontrollida, kas kontsentratsiooni ja aja sõltuvuse tõus on 45 kraadi ($n = 1$) või on kontsentratsiooni, aja ning mõju vaheline sõltuvus laugem (näiteks $n = 2$) või järsem (näiteks $n = 0,8$). Viimasel juhul on väga soovitatav edasiste kokkupuudete kontsentratsioone ja ajavahemikke selle alusel kohandada.

▼ **M4****IV kokkupuude. Põhiuuring**

- Kummastki soost üks loom iga kontsentratsiooni ja ajavahemiku kohta; kokku 10 looma.
- Viis loomarühma viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga suuremal kontsentratsioonil ^(e) (2L) mõnevõrra lühemateks kokkupuute ajavahemikeks (ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on $\sqrt{2}$; vt joonis 1).

C × t määramise eeskirja tulemuste matemaatiline tõlgendamine

11. Nelja või viie kokkupuutekontsentratsiooniga ja viie ajavahemikuga C × t määramise eeskiri annab tulemuseks vastavalt 20 või 25 andmepunkti. Kõnealuste andmepunktide põhjal on võimalik arvutada C × t seos statistilise analüüsi abil (16).

Võrrand 1:

$$\text{Probit}(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

kus C = kontsentratsioon; t = kokkupuute kestus, või

võrrand 2:

$$t_{\text{oine}} = f(C^n t)$$

kus n = b_1/b_2 .

Võrrandi 1 abil on võimalik arvutada LC₅₀ väärtus konkreetse ajavahemiku jaoks (näiteks 4 tundi, 1 tund, 30 minutit või muu ajavahemik katsetatud ajavahemike piires), kasutades väärtust P = 5 (50 % vastus). Pange tähele, et Haberi seadus on kohaldatav ainult juhul, kui n = 1. LC₀₁ saab arvutada P = 2,67 alusel.

^(e) Mõnikord võib olla vajalik suurendada kontsentratsiooni (2L) ja kasutada uusi veelgi väiksemate vahedega ajavahemikke; ajavahemikud moodustavad geomeetrilise progressiooni, mille tegur on 1,4 ($\sqrt{2}$) ja mille keskel on see aeg, kus esimese kokkupuute raames leiti minimaalne letaalne kontsentratsioon. Kokkupuute minimaalne kestus peaks eelistatavalt olema pikem kui 5 minutit; kokkupuute kestus ei tohiks ületada 8 tundi.

▼B**B.3. ÄGE MÜRGISUS (NAHAKAUDNE)****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust (A).

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust (B).

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Testaine kantakse astmeliste annustena mitme rühma katseloomade nahale nii, et üks rühm saab ühesuguse annuse. Järgnevalt jälgitakse mõju ja surmajuhtumite esinemist. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

Tõsiste ja kestvatele kannatustele ja valule viitavate märkidega loomad võib vaja olla humaanselt surmata. Testaineid pole vaja annustada moel, mis teadaolevalt tekitab märgatavat söövitavatest või ärritavatest omadustest tingitud valu ja kannatusi.

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Puuduvad.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS**1.6.1. Ettevalmistused**

Loomi hoitakse enne katset vähemalt viis päeva katsepuurides katsele vastavatel pidamis- ja söötmingimustel. Täiskasvanud noored terved katseloomad randomiseeritakse enne katset ja jagatakse katserühmadesse. Ligikaudu 24 tundi enne katset eemaldatakse pügamise või raseerimise teel katseloomade keha seljaosalt karvkate. Karvkatte pügamisel või raseerimisel tuleb vältida naha marrastamist, kuna see võib mõjutada naha läbilaskvust. Testaine nahale kandmiseks tuleb vabastada vähemalt 10 % kehapinnast. Tähtete, vajaduse korral peenestatud ainete puhul tuleks testainet nahaga hea kokkupuute saavutamiseks niisutada piisava koguse vee või sobiva kandjaga. Kandja kasutamisel tuleb arvestada selle mõjuga testaine nahaläbimisevõimele. Vedelaid testaineid kasutatakse üldjuhul lahjendamata kujul.

1.6.2. Katsetingimused**1.6.2.1. Katseloomad**

Kasutada võib täiskasvanud rotte või küülikuid. Kasutada võib ka muid liike, kuid seda tuleb põhjendada. Kasutada tuleks tavapäraseid laboritöös kasutatavaid liine. Kasutatavate katseloomade masside erinevus katse alguses kummagi soo puhul eraldi ei tohiks ületada ± 20 % vastavast keskmisest.

▼B1.6.2.2. *Katseloomade arv ja sugu*

Iga annuse taseme kohta tuleb kasutada vähemalt viit katselooma. Nad peaksid olema samast soost. Emasloomade kasutamisel ei tohiks nad olla poeginud ega tiined. Kui on andmeid selle kohta, et ühe soo esindajad on märgatavalt tundlikumad, tuleks kasutada sellest soost loomi.

Märkus: ägeda mürgisuse katsetes närilistest kõrgemate loomadega tuleks kaaluda väiksema arvu loomade kasutamist. Annused tuleks valida hoolikalt ja vältida tuleks mõõdukalt mürgiste annuste ületamist. Testaine surmavate annuste manustamist tuleks sellistes katsetes vältida.

1.6.2.3. *Annused*

Erinevaid annusemäärasid peaks olema küllaldaselt, vähemalt kolm, ja nende vahed peaksid olema sellised, et saadakse erinevate mürgistusnähtude ja suremusega katserühmad. Annusemäärade valikul tuleks arvesse võtta mis tahes võimalikku ärritavat või söövitavat mõju. Andmeid peaks olema küllaldaselt annuse/reaktsioonikõvera koostamiseks ja võimalusel LD₅₀ nõuetekohaseks määramiseks.

1.6.2.4. *Piirsalduskatse*

Eespool kirjeldatud meetodi kohaselt võib teha piirsalduskatse viiest isas- ja viiest emasloomast koosnevas rühmas annusega vähemalt 2 000 mg/kg kehakaalu kohta. Kui katses esineb ühendiga seotud suremust, võib kaaluda täiemahulise uuringu tegemist.

1.6.2.5. *Vaatlusperiood*

Vaatlusperioodi kestus peaks olema vähemalt 14 päeva. Vaatlemise kestust ei tohiks siiski järgalt fikseerida. See peaks sõltuma mürgistusnähtudest, nende ilmnemise kiirusest ja paranemisperioodi pikkusest; seega võib seda vajadusel pikendada. Mürgistusnähtude ilmnemise ja kadumise aeg, nende kestus ja surma aeg on väga olulised, eriti kui surm saabub sageli hiljem.

1.6.3. **Katse käik**

Loomi tuleks puurides pidada ühekaupa. Testaine tuleks kanda ühtlaselt alale, mis moodustab ligikaudu 10 % kogu kehapiinast. Väga mürgiste ainete puhul võib katta väiksema osa kehapiinast, kuid võimalikult suur osa pinnast tuleks katta võimalikult õhukese ja ühtlase kihiga.

Testainet tuleks 24tunnise kokkupuuteperioodi jooksul poorse marli- sideme ja mitteärritava kleeplindi abil naha vastas hoida. Manustamiskoht tuleks veel lisaks sobival moel kinni katta, et hoida marli- sidet ja testainet paigal ja vältida testaine allaneelamist katselooma poolt. Et vältida testaine allaneelamist, võib kasutada looma liikuvust piiravaid vahendeid, kuid looma täielikku fikseerimist ei soovitata.

▼B

Kokkupuuteperioodi lõpus tuleks testaine jääk nahalt võimaluse korral veega või muu sobiva puhastusmeetodi abil eemaldada.

Vaatlustulemused tuleks vaatluse käigus süstemaatiliselt registreerida. Iga looma kohta tuleb pidada eraldi arvestust. Esimesel päeval tuleks loomi vaadelda tavapärasest sagedamini. Vähemalt kord tööpäevas tuleks läbi viia põhjalik kliiniline uuring; muid vaatlusi tuleks teha iga päev, rakendades sobivaid abinõusid loomade kao piiramiseks uuringus, nt surnuna leitud loomad lahata või külmutada ja nõrgad või surevad loomad eraldada või surmata.

Vaadelda tuleks muutusi nii karvkattes, testainega töödeldud nahas, silmades ja limaskestades kui ka hingamis- ja vereringeelundkonnas, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses aktiivsuses ja käitumises. Erilist tähelepanu tuleks pöörata värinatele, krampidele, süljeeritusele, kõhulahtisusele, letargiale, unele ja koomale. Surmahetk tuleb registreerida võimalikult täpselt. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad. Registreerida tuleks kõik makropatoloogilised muutused. Vastaval näidustusel tuleks võtta koeproove histopatoloogilisteks uuringuteks.

Mürgisuse hindamine teisel sool

Uuringute lõpetamisel ühest soost katseloomadega annustatakse vähemalt viiest vastassoost loomast koosnevale rühmale, et kontrollida, ega selle soo esindajad testaine suhtes märgatavalt tundlikumad pole. Üksikjuhtudel võib olla õigustatud väiksema arvu loomade kasutamine. Kui on küllalt andmeid selle kohta, et uuritavast soost loomad on märgatavalt tundlikumad, võib katsetest vastassoost loomadega loobuda.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, mis iga katserühma puhul näitab katseloomade arvu selle katse algul, iga looma surma aega, muude mürgistusnähtudega loomade arvu, mürgistusnähtude kirjeldust ja lahkamistulemusi. Kõik loomad kaalutakse ja mass registreeritakse vahetult enne testaine manustamist, seejärel igal nädalal ning surmahetkel; kui looma elumus katses ületab ühe päeva, tuleks arvutada ja registreerida tema massimuutused. Ühendiga seotud kannatuste ja valu tõttu humaanselt surmatud loomad registreeritakse ühendiga seotud suremusena. Tunnustatud meetodi kohaselt määratakse LD₅₀.

Andmetele hinnangu andmisel tuleks arvesse võtta kõigi kõrvalekallete, sealhulgas käitumuslike ja kliiniliste kõrvalekallete, makropatoloogiliste kahjustuste, kehamassi muutuste, suremuse ja mis tahes muude mürgistusnähtude mis tahes võimalikku sõltuvust kokkupuutest testainega ning nende esinemissagedust ja tõsidust.

3. **ARUANDLUS**

3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

▼B

- liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne;
- katsetingimusi (sealhulgas naha puhastamise meetodit ja sideme tüüpi: oklusiivside või tavaline side);
- annuseid (kandja kasutamisel koos kandjaga ja kontsentratsioonide);
- katseloomade sugu;
- tabelit reaktsiooni andmetega soo ja annuse määra järgi (st katse käigus surnud või surmatud loomade arvu, mürgistusnähtudega loomade arvu, kokkupuutes olnud loomade arvu);
- surma aega, arvestatuna annuse saamise ajast loomade humaanse surmamise põhjusi ja seejuures rakendatud kriteeriume;
- kõiki vaatlusandmeid;
- täiemahulises uuringus kasutatud soo 14 päeva kestel määratud LD₅₀ väärtust (märkega määramismeetodi kohta);
- leitud LD₅₀ väärtuse 95 % usaldusvahemikku (kui seda on võimalik esitada);
- annuse/suremuse kõverat ja selle tõusu (kui määramismeetod seda võimaldab);
- lahkamistulemusi;
- kõiki histopatoloogilisi leide;
- kõiki katsetulemusi teisest soost loomade puhul;
- tulemuste analüüsi (erilist tähelepanu tuleks pöörata katse ajal tehtud viidud humaanse surmamise võimalikule mõjule arvatud LD₅₀ väärtusele);
- tulemuste tõlgendust.

3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).



B.4. ÄGE MÜRGISUS: NAHAÄRRITUS/-SÖÖVITUS

1. MEETOD

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD TG 404ga (2002).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesoleva ajakohastatud meetodi ettevalmistamisel pööratakse erilist tähelepanu võimalikele parandustele seoses loomade heaoluga ja kogu olemasoleva katseainet käsitleva teabe hindamisele, et vältida mittevajalikke katseid laboriloomadega. Käesoleva meetodi hulka kuulub soovitus, et enne kirjeldatud, aine söövitavust ja ärritavust uuriva *in vivo* katse tegemist analüüsitaks olemasolevate asjaomaste andmete osakaalu. Kui saadaolevad andmed on ebapiisavad, saab neid täiendada järjestikuste katsete tegemise abil (1). Katsete tegemise strateegia, mis on esitatud käesoleva meetodi lisas, hõlmab valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* katsete sooritamist. Lisaks sellele soovitatakse vastavalt olukorrale, et *in vivo* algkatsetes kohaldatakse looma suhtes kolme katselappi järjestikku, mitte korraga.

Nii mõistlike teaduslike meetodite kui ka loomade heaolu huvides ei tehta *in vivo* katseid enne, kui on hinnatud kogu kättesaadava katseaine võimalikku naha söövitamist/ärritamist käsitleva teabe osakaalu. Sellisteks andmeteks on tõendid varasematest inimeste ja/või laboriloomadega tehtud uurimustest, tõendid ühe või mitme struktuuriliselt samalaadse aine või selliste ainete segude põhjustatud söövituse ja ärrituse kohta, aine tugevale happesusele või leelisusele viitavad andmed (2, 3) ning valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* või *ex vivo* katsete tulemused (4, 5, 5a). Käesolev analüüs peaks vähendama vajadust teha *in vivo* katseid selliste ainetega, mille nahasöövitavuse ja -ärritavuse kohta on muudest uurimustest juba piisavalt tõendeid saadud.

Eelistatud järjestikuste katsete tegemise strateegia, mis hõlmab valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* või *ex vivo* katsete sooritamist söövitavuse ja ärritavuse kohta, on esitatud käesoleva meetodi lisas. Strateegia töötati välja OECD seminaril (6), millest osavõtjad seda ühehäälselt soovitasid, ja see kiideti heaks soovitusliku katsestrateegiana keemiliste ainete klassifitseerimist käsitlevas globaalselt harmoneeritud süsteemis (GHS) (7). Soovitatakse, et nimetatud katsestrateegiat kasutataks enne *in vivo* katsete tegemist. Uute ainete katsetamisel on soovitatav etapiviisiline katsete tegemine teaduslikult usaldatavate andmete tootmiseks aine söövitavuse ja ärritavuse kohta. Olemasolevate ainete puhul, mille nahasöövitavuse ja -ärritavuse kohta ei ole piisavalt andmeid, tuleks strateegiat kasutada puuduvate andmete hankimiseks. Kui otsustatakse kasutada muud katsetamisstrateegiat või menetlust või mitte kasutada etapiviisilist katsete tegemist, siis tuleks seda otsust põhjendada.

Kui söövitavust või ärritavust ei saa kindlaks määrata järjestikuste katsete tegemise strateegia kohaselt osakaalu analüüsimise abil, tuleks kaaluda *in vivo* katset (vt lisa).

▼B

1.2. MÕISTED

Nahaärritus – pöörduva nahakahjustuse tekkimine kuni neli tunni jooksul pärast katseaine manustamist.

Nahasöövitus – pöördumatu nahakahjustuse, s.t nähtava marrasknahast pärisnahani ulatuva nekroosi tekkimine kuni nelja tunni jooksul pärast katseaine manustamist. Tüüpilised söövitusreaktsioonid on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14päevase jälgimisperiоди lõpus naha heledaks muutumise tõttu värvimuutus, täielik karvakadu ja armid. Küsitavate kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogiat.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritavat ainet manustatakse ühekordse annusena katselooma nahale, katselooma töötlemata kehapiinad toimivad kontrollina. Ärritavuse/-söövitavuse astet konstateeritakse ja märgitakse täpsustatud intervallid ning seda astet kirjeldatakse mõjude hindamise täiendamiseks. Uurimus kestab niikaua, et vaadeldud mõjude pöörduvust või pöördumatust saaks hinnata.

Loomad, kellel on jätkuvalt tugeva stressi ja/või valu tunnused igal katsetapil, tuleks humaanselt tappa ja seda võetakse aine hindamisel arvesse. Suremas olevate ja tugevalt kannatavate loomade humaanse tapmise kriteeriumid on toodud viites 8.

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. *In vivo* katse ettevalmistamine1.4.1.1. *Loomaliikide valik*

Eelistatud laboriloom on albiinoküülik, kasutatakse terveid noori täiskasvanud küülikuid. Muude liikide kasutamist tuleks põhjendada.

1.4.1.2. *Loomade ettevalmistamine*

Ligikaudu 24 tunni jooksul enne katset lõigatakse loomade seljaosa karvad lühikeseks. Tuleks vältida naha marrastamist ning kasutama peaks üksnes terveid, terve nahaga loomi.

Mõnedel küüliku liinidel esineb tihedaid karvalaike, mis on silmatorkavamad teatavatel aastaegadel. Selliseid tiheda karvastikuga kehapiinad ei tohiks kasutada katsetamise kohana.

1.4.1.3. *Loomade pidamise ja toitmise tingimused*

Loomi hoitakse eraldi puurides. Loomade katseruumi temperatuur küülikutel peaks olema 20 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, peaks seda hoidma vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Toitmisel võib kasutada tavapäraselt labori toiduvalikut koos piiramatul hulgal joogiveega.

▼B1.4.2. **Katsemenetlus**1.4.2.1. *Katseaine manustamine*

Katseainet tuleks panna väikesele nahapinnale (ligikaudu 6 cm²) ja see kaetakse marlilapiga, mis kinnitatakse nahka mitteärritava teibiga. Kui ainet ei ole võimalik otse peale kanda (nt vedelikud või mõned pastad), kantakse katseaine esmalt marlilapile, mis seejärel asetatakse nahale. Lappi hoitakse õrnalt vastu nahka sobiva, pooltihke sideme abil kogu mõjuaja. Kui katseaine kantakse lapile, tuleks see lapp kinnitada nahale selliselt, et aine puutuks nahaga hästi kokku ja leviks nahal ühtlaselt. Tuleks tõkestada looma ligipääsu lapile ja katseaine allaneelamist või sissehingamist.

Vedalaid katseaineid kasutatakse üldiselt lahjendamata kujul. Tehes katseid tahkete ainetega (mida võib vajaduse korral pulbristada), tuleks katseainet niisutada väikese koguse veega (või vajaduse korral muu sobiva kandeainega), et tagada hea kokkupuude nahaga. Kui kasutatakse muid kandeaineid kui vesi, on kandeaine võimalik mõju katseaine põhjustatud nahaärritusele minimaalne või olematu.

Mõjuaja lõpus, mis kestab tavaliselt neli tundi, allesjäänud katseaine eemaldatakse võimaluse korral vee või sobiva lahustiga, muutmata marrasknaha olemasolevat reaktsiooni või puutumatusi.

1.4.2.2. *Annusmäär*

Uuritavale pinnale kantakse 0,5 ml vedelat või 0,5 g tahket ainet või pastat.

1.4.2.3. *Algkatse (ühe loomaga in vivo nahaärritus-/söövitavuskatse)*

On eriti soovitatav, et algselt tehtaks *in vivo* katse ühe loomaga, eriti juhul, kui aine võib tõenäoliselt olla söövitav. See on kooskõlas järjestikuste katsete tegemise strateegiaga (vt 1. lisa).

Kui osakaalu analüüsi põhjal on tõendatud, et aine on söövitav, ei ole vaja loomadega katseid jätkata. Enamiku võimalike söövitavate ainete puhul ei ole tavaliselt täiendava *in vivo* katse tegemine vajalik. Juhul, kui lisateavet peetakse vajalikuks puudulike tõendite tõttu, võidakse sooritada piiratud loomkatse, kasutades järgmist lähenemist: Loomale pannakse üksteise järel kuni kolm katselappi. Esimene lapp eemaldatakse kolme minuti pärast. Kui ei täheldata tõsist nahareaktsiooni, asetatakse teine lapp ja eemaldatakse tunni aja pärast. Kui vaatlus antud etapil viitab sellele, et mõjutamist võib humaanselt pikendada nelja tunnini, pannakse peale kolmas lapp ja see eemaldatakse nelja tunni pärast, misjärel reaktsiooni hinnatakse.

Kui sööbiv mõju on vaadeldav pärast ükskõik millist kolmest järjestikusest mõjutamisest, lõpetatakse katse kohe. Kui sööbiv mõju ei ole vaadeldav pärast viimase lapi eemaldamist, jälgitakse looma 14 päeva jooksul, välja arvatud juhul, kui söövitav ei teki varem.

▼B

Kui katseaine ei tekita söövitust, kuid võib olla ärritav, asetatakse üks lapp ühele loomale neljaks tunniks.

1.4.2.4. *Kinnitav katse (in vivo nahaärritust käsitlev katse täiendavate loomadega)*

Kui söövitavat toimet ei ole algkatses jälgitud, tuleks ärritavat või negatiivset reaktsiooni kinnitada kahe muu looma kasutamise abil neljatunnisel mõjuperioodil. Kui algkatses on jälgitud ärritavat mõju, tuleks seejärel sooritada kinnitav katse või mõjutada kahte muud looma korraga. Erandkorras, kui algkatset ei ole tehtud, võib kahele või kolmele loomale asetada ühe lapi, mis eemaldatakse nelja tunni pärast. Kui kasutatakse kahte looma, ei ole vaja lisakatset teha, kui mõlematel esineb sama reaktsioon. Muul juhul tehakse katse ka kolmanda loomaga. Ebaselgeid reaktsioone on vaja hinnata, tehes katseid muude loomadega.

1.4.2.5. *Jälgimisperiood*

Jälgitakse seni, kuni on võimalik täielikult hinnata vaadeldud mõjude pöörduvust. Katse tuleks lõpetada igal juhul siis, kui loomal on jätkuvalt tugeva valu või stressi tunnused. Mõjude pöörduvuse kindlaksmääramiseks tuleks jälgida loomi kuni 14 päeva pärast lapi eemaldamist. Kui pöörduvus ilmneb enne 14 päeva möödumist, tuleks katse lõpetada sel ajal.

1.4.2.6. *Kliinilised vaatlused ja naha reaktsioonide hindamine*

Kõikidel loomadel uuritakse nahapunetuse ja turse nähte, reaktsioone hinnatakse 60 minuti pärast, seejärel 24, 48 ja 72 tundi pärast lapi eemaldamist. Ühe loomaga algkatses uuritakse uuritavat pinda samuti vahetult pärast lapi eemaldamist. Nahareaktsioone hinnatakse ja registreeritakse vastavalt allpool tabelis toodud hinnetele. Kui nahal on kahjustus, mida ei suudeta tuvastada ärrituse või söövitusest 72 tunni jooksul, võib olla vajalik jälgida kuni 14. päevani, et kindlaks määrata mõjude pöörduvus. Lisaks ärrituse jälgimisele tuleks täielikult kirjeldada ja registreerida kõik sellised paiksed toksilised mõjud nagu naha rasva lahustumine ja mis tahes organismi kahjulikud mõjud (nt mõjud mürgisuse kliinilistele tunnustele ja kehakaalule). Ebaselgete reaktsioonide selgitamiseks tuleks teha histopatoloogiline uurimine.

Naha reaktsioonide hindamine on tingimata subjektiivne. Naha reaktsiooni hindamise ühtlustamiseks ning katselaboratooriumide ning jälgivate või tõlgendavate isikute abistamiseks on vaja vaatlusi tegevatel isikutel piisavalt tundma õppida kasutatavat hindamissüsteemi (vt tabelit allpool). Illustreeritud juhis nahaärrituse või muude kahjustuste hindamiseks võib olla abiks (9).

2. **ANDMED**

2.1. **TULEMUSTE ESITAMINE**

Uurimuse tulemused esitatakse tabeli kujul lõplikus katsearuandes ja peaks hõlmama kõiki punktis 3.1 nimetatud asju.

▼B

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE

Nahaärrituse määramisi tuleks hinnata vastavalt kahjustuse laadile ja raskusele ning nende pöörduvusele või pöördumatusele. Üksikud määramised ei esinda aine ärritavate omaduste absoluutset taset, kuna samuti hinnatakse katseaine muid mõjusid. Selle asemel tuleks vaadelda kontrollväärtustena üksikuid määramisi, mis vajavad hindamist koos kõikide muude uurimuses tehtud vaatlustega.

Nahakahjustuste pöörduvust tuleb võtta arvesse ärritusreaktsioonide hindamisel. Kui sellised reaktsioonid nagu alopeetsia (piiratud pinnal), liigsarvestus, hüperplaasia ja kestendus jätkuvad 14päevase jälgimisperioodi lõpus, tuleks käsitada katseainet naha ärritajana.

3. ARUANDLUS

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab hõlmama järgmist teavet.

Põhjendus *in vivo* katse tegemiseks: olemasolevate katseandmete, sh järjestikuste katsete tegemise strateegia põhjal saadud tulemuste osakaalu analüüs:

- varasematest katsetest saadud asjaomaste andmete kirjeldus;
- katsestrateegia igal etapil saadud andmed;
- *in vitro* katsete kirjeldus, sh menetluste üksikasjad, katse/-võrdlusainetest saadud tulemused;
- osakaalu analüüs *in vivo* uurimuse sooritamiseks.

Katseaine:

- tunnusandmed (nt CASi number, algupära, puhtus, tuntud lisandid, partii number);
- füüsikaline laad ja füüsikalis-keemilised omadused (nt pH, lenduvus, lahustuvus, stabiilsus);
- kui tegu on seguga, selle koostis ja koostisosade suhtelised protsendimäärad.

Kandeaine:

- nimetus, kontsentratsioon (vajaduse korral), kasutatud kogus;
- kandeaine valiku põhjendamine.

Katseloomad:

- kasutatud liigid/liin, põhjendus muude loomade kui albiinoküülidete kasutamiseks;
- igast soost loomade arv;
- üksikute loomade kaalud katse alguses ja lõpus;
- vanus katse alguses;
- päritolu, elamistingimused, toitumine jne.

▼B

Katsetingimused:

- lapi asetuskoha ettevalmistamine;
- üksikandmed lapi materjali kohta ning asetustehnika;
- katseaine ettevalmistust, pealekandmist ja eemaldamist käsitlevad üksikasjad.

Tulemused:

- iga looma ärritus-/söövitusreaktsioonide määramised igal mõõtmiskorral tabeli kujul;
- kõikide täheldatud kahjustuste kirjeldused;
- täheldatud ärrituse või söövituse laadi ja astme jutustav kirjeldus ja võimalikud histopatoloogilised leiud;
- muude kahjulike paiksete (nt naha rasva lahustumine) ning nahaärritusele ja -söövitusele lisaks kogu organismile suunatud mõjude kirjeldus.

Tulemuste arutelu.

4.

VIITED

- 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 26, 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) Testing Method B.40 Skin Corrosion.
- 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. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://wwwl.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
 - 7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://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://wwwl.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.

(Saadaval taotluse korral OECD sekretariaadist).

▼B*Tabel 1***NAHA REAKTSIOONIDE MÄÄRAMINE****Nahapunetuse ja kooriku tekkimine**

Nahapunetust ei esine	0
Väga kerge nahapunetus (vaevumärgatav)	1
Selgesti nähtav nahapunetus	2
Mõõdukas kuni tõsine nahapunetus.....	3
Tõsine nahapunetus (tugev punetus) – kooriku tekkimine, mis takistab nahapunetusele punktide andmist.....	4

Suurim võimalik punktide arv: 4

Turse tekkimine

Turset ei esine	0
Väga kerge turse (vaevumärgatav)	1
Kerge turse (nahapinna servad on kindlalt üleval)	2
Mõõdukas turse (ligikaudu 1 mm üleval).....	3
Tugev turse (enam kui 1 mm üleval ja levinud ainega mõjutatud alast kaugemale)	4

Suurim võimalik punktide arv: 4

Ebaselgete reaktsioonide selgitamiseks tuleks teha histopatoloogiline uuring.



Lisa

Nahaärritavuse ja -söövitavuse kohta järjestikuste katsete tegemise strateegia

ÜLDKAALUTLUSED

Mõistlike teaduslike meetodite ja loomade heaolu huvides on oluline vältida loomade tarbetut kasutamist ja vähendada selliste katsete tegemist, mis tõenäoliselt tekitavad loomadel raskeid tagajärgi. Kogu teavet aine võimaliku nahaärritavuse/-söövitavuse kohta tuleks hinnata enne *in vivo* katse tegemise kaalumist. Kui on juba olemas piisavalt tõendeid katseaine klassifitseerimiseks nahaärritavuse või -söövitavuse järgi, ei ole vaja sooritada katset laboriloomadega. Seetõttu vähendaks osakaalu analüüsi kasutamine ja järjestikuste katsete tegemise strateegia vajadust *in vivo* katsete tegemise järele, eriti siis, kui aine tõenäoliselt tekitab tõsiseid reaktsioone.

On soovitatav, et kasutataks osakaalu analüüsi olemasoleva, nahaärritavust ja -söövitavust käsitleva teabe hindamiseks, et kindlaks määrata, kas sellise võime iseloomustamiseks tuleks teha lisauuringuid, v.a *in vivo* nahauuringud. Kui on vaja teha täiendavaid uuringuid, on soovitatav, et asjaomaste katseandmete parandamiseks kasutataks järjestikuste katsete tegemise strateegiat. Ainete puhul, millega ei ole katseid tehtud, tuleks kasutada järjestikuste katsete tegemise strateegiat sellise andmekogumi parandamiseks, mida läheb vaja nahaärritavuse ja -söövitavuse hindamiseks. Käesolevas lisis kirjeldatud katsete tegemise strateegia töötati välja OECD seminaril (1) ning see kinnitati ja seda laiendati hiljem keemiliste ainete mõju inimeste tervisele ja keskkonnale käsitleva lihtsustatud integreeritud ohu klassifitseerimise süsteemis, nagu see kiideti heaks kemikaalikomitee ja kemikaalitöörühma 28. ühisistungil 1998. aasta novembris (2).

Kuigi käesolev järjestikuste katsete tegemise strateegia ei ole B.4 katsemeetodi lahutamatu osa, väljendab see soovivat lähenemist nahaärritavuse ja -söövitavuse tunnuste kindlaksmääramisele. Nimetatud lähenemine väljendab nii head tava kui ka eetilist võrdluspunkti *in vivo* katsete tegemiseks nahaärritavuse ja -söövitavuse kohta. Katsemeetod annab juhiseid *in vivo* katse sooritamiseks ja esitab kokkuvõtte teguritest, mida käsitletakse enne katse alustamist. Strateegia on lähenemine katseaine nahaärritavus- ja -söövitavusomadusi käsitlevate olemasolevate andmete hindamisele ja mitmetasandiline lähenemine selliste asjaomaste andmete tekitamisele, mille suhtes on vaja teha lisauuringuid või mille suhtes ei ole tehtud uuringuid. See soovitab samuti nahaärritavust ja -söövitavust käsitlevaid valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* või *ex vivo* katsete sooritamist teataval asjaoludel.

HINDAMISTE JA KATSETE TEGEMISE STRATEEGIA KIRJELDUS

Enne katse sooritamist järjestikuste katsete tegemise strateegia osana (joonis) tuleks hinnata kogu kättesaadavat teavet *in vivo* nahauuringute tegemise vajaduse kindlaksmääramiseks. Kuigi üksikute parameetrite hindamisel võib saada märkimisväärset teavet (nt äärmine pH-väärtus), tuleks olemasolevat teavet tervikuna arvesse võtta. Kõigi kõnealuse aine või selle analoogide mõjusid käsitlevate andmete hindamiseks tuleks teha otsus osakaalu kohta ja esitada selle otsuse kohta põhjendus. Esmalt rõhutatakse inimestelt ja loomadelt varem saadud ainet käsitlevaid andmeid ja seejärel *in vitro* või *ex vivo* katsete tulemusi. Söövitavaid aineid käsitlevaid *in vivo* katseid tuleks võimaluse korral vältida. Katsete tegemise strateegias võetakse arvesse järgmisi tegureid.

▼B

Inimestelt ja loomadelt varem saadud andmete hindamine (1. etapp). Inimestelt varem saadud andmeid, nt kliinilised või töökohal uuringud ning juhtumia-ruanded, ja/või loomadega tehtud katseid käsitlevaid andmeid, nt ühekordsete või korduvate naha vastuvõtlikkust käsitlevate mürgisusuuringute tulemused, tuleks võtta arvesse esmalt, kuna need annavad sellist teavet, mis on vahetult seotud nahale mõjumisega. Tuntud ärritavuse või söövitavusega ainetega ja nendega, mis on selgelt mittesöövitavad või -ärritavad, ei ole vaja *in vivo* katseid teha.

Struktuur-aktiivusanalüüs (SAR) (2. etapp). Struktuuriliselt seotud ainetega tehtud katsete tulemusi tuleks võimaluse korral arvesse võtta. Kui struktuuriliselt samalaadsete ainete või selliste ainete segude kohta on olemas piisavalt inimestelt ja/või loomadelt saadud andmeid, saame eeldada, et hinnatav katseaine põhjustab samu reaktsioone. Sellistel juhtudel ei ole vaja katseainega katset teha. Negatiivsed tulemused struktuuriliselt samalaadsete ainete või selliste ainete segudega tehtud katsete kohta ei anna piisavalt tõendeid aine mitteärritavuse/-mittesöövitavuse kohta järjekuste katsete tegemise strateegia alusel. Valideeritud ja heakskiidetud struktuur-aktiivusanalüüsi abil tuleks kindlaks teha nii nahasöövituse kui ka -ärrituse.

Füüsikalised-keemilised omadused ja keemiline reaktiivsus (3. etapp). Ained, mille äärmine pH-väärtus on näiteks $< 2,0$ ja $> 11,5$, võivad avaldada tõsist paikset mõju. Kui äärmine pH-väärtus on aluseks aine nahaärritavuse kindlakstegemisele, siis võib samuti võtta arvesse happe-/alusreservi (või puhverduvõimet) (3, 4). Kui puhverduvõime viitab sellele, et aine ei saa olla nahka ärritav, siis tuleks selle kinnitamiseks teha lisakatse, soovitatavalt valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* või *ex vivo* katsete abil (vt 5. ja 6. etapp).

Nahakaudne mürgisus (4. etapp). Kui kemikaal on tõestatult naha kaudu väga mürgine, ei ole otstarbekas teha *in vivo* nahaärritust ja -söövitust käsitlevat katset, kuna tavapärane katseaine kogus võib ületada väga mürgist annust ning põhjustada seetõttu loomade surma või tõsiseid kannatusi. Lisaks sellele, kui on juba tehtud nahakaudset mürgisust käsitlevaid katseid albiinoküülikutega kuni piirarvumäärani 2 000 mg/kg kehakaalu kohta või rohkem ning ei ole tuvastatud nahaärritust või -söövitust, ei ole vaja teha lisakatset nahaärrituse ja -söövituse kohta. Tarvis on meeles pidada mõned kaalutlused, kui hinnatakse varem sooritatud katsete tulemusi ägeda nahakaudse mürgisuse kohta. Näiteks võib nahakahjustuste kohta antud teave olla puudulik. Katsetes ja vaatlustel võib kasutada muid liike kui küülik ning liigid võivad oma reaktsioonide tundlikkuse poolest suuresti erineda. Samuti ei pruugi loomadel kasutatava katseaine vorm olla sobiv nahaärrituse/-söövituse hindamiseks (nt ainete lahjendamine nahakaudse mürgisuse kohta katsete tegemiseks (5)). Juhtudel, mil hästi kavandatud ja nahakaudset mürgisust käsitlevad katsed on sooritatud küülikutega, võidakse käsitada negatiivseid leide piisavate tõenditena selle kohta, et aine ei ole söövitav või ärritav.

In vitro või ex vivo katsete tulemused (5. ja 6. etapp). Aineid, mis on näidanud söövitavaid või tugevalt ärritavaid omadusi valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* või *ex vivo* katsetes (6, 7), mis on kavandatud nimetatud konkreetsete mõjude hindamiseks, ei ole vaja katsetada loomade peal. Võib eeldada, et sellistel ainetel on samalaadsed tõsised mõjud *in vivo*.

▼B

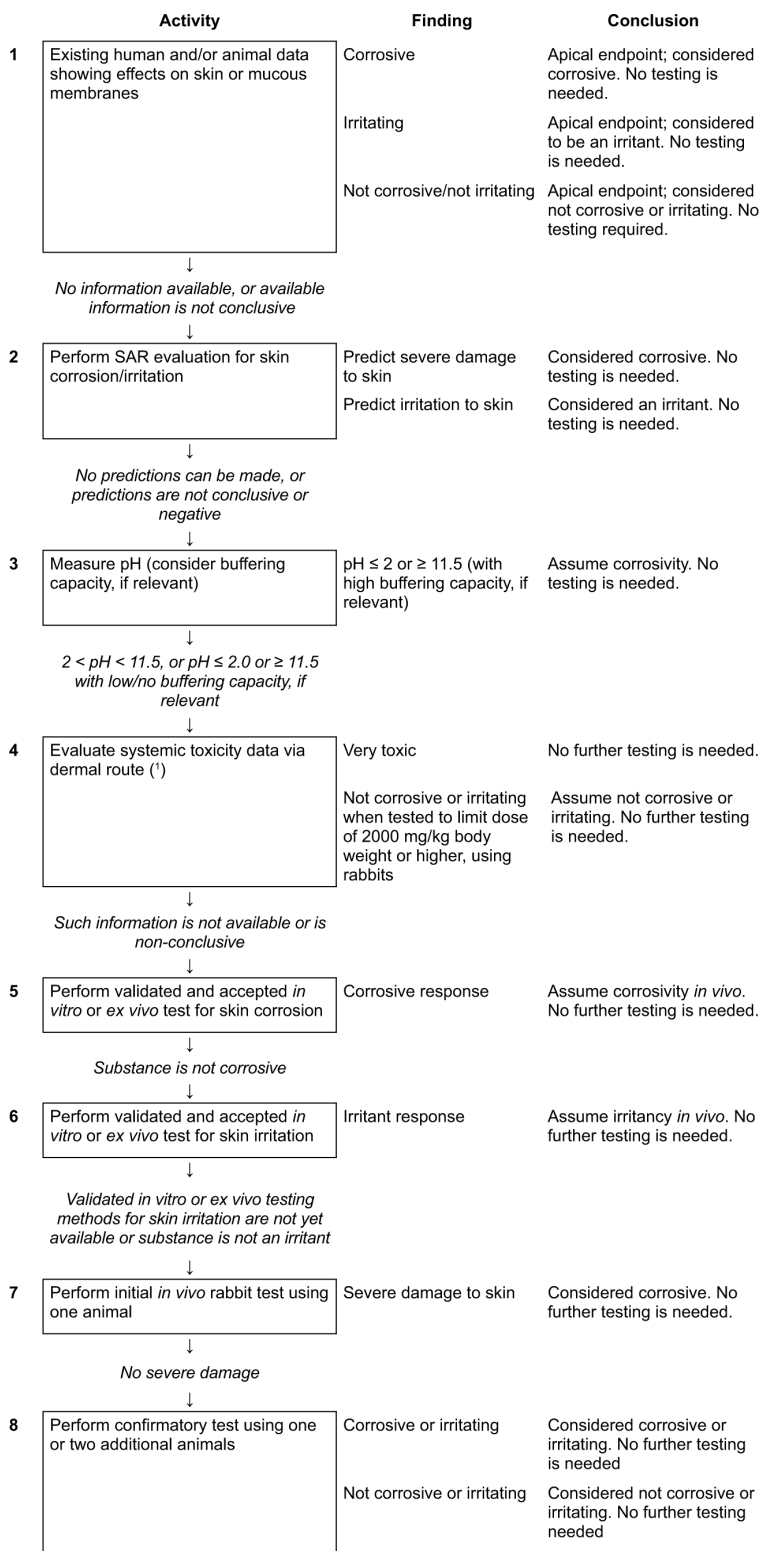
In vivo katse küülikutega (7. ja 8. etapp). Kui tuleks teha osakaaluanalüüs *in vivo* katse sooritamise kohta, peaks see algama eelkatsest ühte looma kasutades. Kui nimetatud katse tulemused viitavad aine söövitavusele nahal, ei tohiks lisakatseid teha. Kui söövitavat toimet ei ole algkatses jälgitud, tuleks ärritavat või negatiivset reaktsiooni kinnitada kahe muu looma kasutamise abil neljatunnisel mõju-perioodil. Kui algkatses on jälgitud ärritavat mõju, tuleks seejärel sooritada kinnitav katse või mõjutada kahte muud looma korraga.

VIITED

- 1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop söövitavusega Harmonization of Validation and Acceptance Criteria mitesöövitavad Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22-24 January 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, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Qass/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) Testing Method 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.



Joonis

NAHAÄRRITUST/-SÖÖVITUST KÄSITLEVATE KATSETE JA HINDAMISE STRATEEGIA


⁽¹⁾ can be considered before Steps 2 and 3.

▼B

B.5. ÄGE MÜRGISUS: SILMADE ÄRRITUS/SÖÖVITUS

1. MEETOD

Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD TG 405ga (2002).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesoleva ajakohastatud meetodi ettevalmistamisel pööratakse erilist tähelepanu võimalikele parandustele seoses loomade heaoluga ja kogu olemasoleva katseainet käsitleva teabe hindamisele, et vältida mittevajalikke katseid laboriloomadega. Käesoleva meetodi hulka kuulub soovitus, et enne kirjeldatud, silmade ägedat söövitust ja ärritust uuriva *in vivo* katse tegemist analüüsitaks olemasolevate asjaomaste andmete osakaalu (1). Kui saadaolevad andmed on puudulikud, saab neid täiendada järjestikuste katsete tegemise abil (2, 3). Katsete tegemise strateegia, mis on esitatud käesoleva meetodi lisas, hõlmab valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* katsete sooritamist. Lisaks sellele on soovitatav enne *in vivo* silmade katse tegemist teha silmade söövituse ennustamiseks *in vivo* nahaärrituse ja -söövituse katse.

Nii mõistlike teaduslike meetodite kui ka loomade heaolu huvides ei tehta *in vivo* katseid enne, kui on hinnatud kogu kättesaadava, katseaine võimalikku silmade söövitamist/ärritamist käsitleva teabe osakaalu. Sellisteks andmeteks on tõendid varasematest inimeste ja/või laboriloomadega tehtud uuringutest, tõendid ühe või mitme struktuuriliselt samalaadse aine või selliste ainete segude põhjustatud söövituse ja ärrituse kohta, aine tugevale happesusele või leelisusele viitavad andmed (4, 5) ning valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* või *ex vivo* silmade söövitust ja ärritust uurivate katsete tulemused (6, 6a). Katseid võib teha enne osakaalu analüüsi või selle tulemusena.

Teatavate ainete puhul võib selline analüüs viidata vajadusele teha *in vivo* katseid aine võimaliku silmade söövitavuse ja ärrituvuse väljaselgitamiseks. Kõikidel sellistel juhtudel on soovitatav esmalt enne *in vivo* silmade katse tegemist teha katse *in vivo* aine nahakaudsete mõjude väljaselgitamiseks ja hinnata tulemusi vastavalt katsemeetodile B.4 (7). Osakaalu analüüsi tegemine ja järjestikuste katsete tegemise strateegia vähendaksid vajadust *in vivo* aine võimalikku silmade söövitavust/ärritavust uuriva katse tegemise järele, mille kohta on muudest katsetest saadud juba piisavalt tõendeid. Kui silmade söövitavust või ärritavust ei suudeta kindlaks määrata järjestikuste katsete tegemise strateegiat kasutades isegi pärast *in vivo* nahasöövitust ja -ärritust uuriva katse tegemist, võib teha *in vivo* silmade söövitust/-ärritust uuriva katse.

▼ **B**

Eelistatud järjestikuste katsete tegemise strateegia, mis hõlmab valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* või *ex vivo* katsete sooritamist söövitavuse ja ärritavuse kohta, on esitatud käesoleva meetodi lisas. Strateegia töötati välja OECD seminaril (8), kus osalenud seda ühehäälselt soovitasid, ja see kiideti heaks soovitusliku katsete tegemise strateegiana keemiliste ainete klassifitseerimist käsitlevas globaalselt ühtlustatud süsteemis (GHS) (9). Soovitatakse, et nimeetatud katsestrateegiat kasutatakse enne *in vivo* katsete tegemist. Uute ainete katsetamisel on soovitatav etapiviisiline katsete tegemine teaduslikult usaldatavate andmete tootmiseks aine söövitavuse ja ärritavuse kohta. Olemasolevate ainete puhul, mille naha ja silmade söövitavuse ja -ärritavuse kohta ei ole piisavalt andmeid, tuleks strateegiat kasutada puuduvate andmete hankimiseks. Kui otsustatakse kasutada muud katsete tegemise strateegiat või menetlust või mitte kasutada etapiviisilist katsete tegemist, siis tuleks seda otsust põhjendada.

1.2. MÕISTED

Silmade ärritus – selliste muutuste tekkimine silmas pärast seda, kui katseainet on manustatud silma eespinnaale, mis täielikult pöörduvad 21 päeva jooksul pärast manustamist.

Silmade söövitus – koekahjustuse tekkimine silmas või tugev füüsiline nägemislangus pärast seda, kui katseainet on manustatud silma eespinnaale, mis on täielikult pöördumatud 21 päeva jooksul pärast aine manustamist.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritavat ainet manustatakse ühekordse annusena katselooma ühte silma, katselooma töötlemata silm toimib kontrollina. Silmade ärrituse/söövituse astet hinnatakse sidekesta, sarvkesta ja vikerkesta kahjustustele punkte andes teatavate intervallide tagant. Muid mõjusid silmas ja kahjulikke süsteemseid mõjusid kirjeldatakse samuti selleks, et hinnata täielikult mõjusid. Katse kestab niikaua, et vaadeldud mõjude pöörduvust või pöördumatust saaks hinnata.

Loomad, kellel on jätkuvalt tugeva stressi ja/või valu tunnused igal katsetapil, tuleks humaanselt tappa ja seda võetakse aine hindamisel arvesse. Suremas olevate ja tugevalt kannatavate loomade humaanse tapmise kriteeriumid on toodud viites (10).

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. *In vivo* katse ettevalmistamine1.4.1.1. *Loomaliikide valik*

Eelistatud laboriloom on albiinoküülik, kasutatakse terveid noori täiskasvanud küülikuid. Muude liikide või liinide kasutamist tuleks põhjendada.

1.4.1.2. *Loomade ettevalmistamine*

Kummagi katsesse valitud looma mõlemat silma uuritakse 24 tunni jooksul enne katse algust. Ei tohiks kasutada loomi, kellel esineb silmade ärritust, silmadefekte või varasemaid sarvkestakahjustusi.

▼B1.4.1.3. *Loomade pidamise ja toitmise tingimused*

Loomi hoitakse eraldi puurides. Loomade katseruumi temperatuur küülikutel peaks olema 20 °C (\pm 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, siis eesmärk on hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Toitmisel võib kasutada tavapärast labori toiduvalikut koos piiramatul hulgal joogiveega.

1.4.2. **Katsemenetlus**1.4.2.1. *Katseaine manustamine*

Katseainet manustatakse iga looma ühe silma sidekestakotti, tõmmates alumist laugu õrnalt silmamunast eemale. Seejärel pigistatakse laud umbes üheks sekundiks õrnalt kinni, et vältida aine silmast väljavalgumist. Teine silm, mida ei töödelda, toimib kontrollina.

1.4.2.2. *Loputamine*

Katseloomade silmi ei tohiks pesta vähemalt 24 tundi pärast katseaine manustamist, välja arvatud tahkete ainete puhul (vt punkt 1.4.2.3.2) ja koheste sööbivate või ärritavate mõjude korral. 24 tunni pärast võib loputada, kui seda peetakse vajalikuks.

Pesemise mõju selgitamiseks ei soovitata kasutada loomade kontrollrühma, välja arvatud juhul, kui see on teaduslikult põhjendatud. Kui on vaja kontrollrühma, kasutatakse kahte küülikut. Pesemise tingimused tuleks hoolikalt dokumenteerida, nt pesemisaeg, pesemislahuse koostis ja temperatuur, pesemise kestus, vedeliku kogus ja voolukiirus.

1.4.2.3. *Annusmäär*1.4.2.3.1. *Vedelike uurimine*

Vedelike uurimiseks kasutatakse 0,1 ml annust. Pumppihustist ei tohi ainet otse silma manustada. Vedelikujuga tuleks väljutada ja koguda mahutisse enne 0,1 ml silma manustamist.

1.4.2.3.2. *Tahkete ainete uurimine*

Tahkete ainete, pastade ja osakeste uurimisel peaks kasutatav kogus olema 0,1 ml või kaaluga kuni 100 mg. Katseaine tuleks jahvatada peeneks tolmuks. Tahke aine kogust tuleks mõõta pärast selle õrnalt tihendamist, nt raputades mõõtemahutit. Kui tahket katseainet ei ole katselooma silmast eemaldatud füsioloogiliste mehhanismide abil esimese vaatluse ajal üks tund pärast käsitlemist, loputatakse silma füsioloogilise soolalahusega või destilleeritud veega.

▼B1.4.2.3.3. *Aerosoolide uurimine*

Soovitavalt kogutakse kõik pumbatavad joad ja aerosoolid enne silma manustamist. Üheks erandiks on survestatud aerosoolmahutites ained, mida ei saa koguda aurustumise tõttu. Sellistel juhtudel tuleks silm hoida lahti ja katseaine panna silma ligikaudu üks sekund kestva lihtsa purskega 10 cm kauguselt otse silma ees. Nimetatud vahemaa võib muutuda sõltuvalt pihusti survest ja sisaldusest. Tuleks olla ettevaatlik, et pihusti surve ei teeks silmale liiga. Mõnel juhul võib osutada vajalikuks hinnata pihusti tugevusest silmale põhjustatud võimalikke „mehaanilisi“ kahjustusi.

Aerosooliannuse suurust võib hinnata katset järgmiselt simuleerides: ainet pihustatakse kaalupaberile otse paberi ees oleva küüliku silma suurusest avausest. Paberi kaalu suurenemise abil hinnatakse silma pihustatud kogust. Lenduvate ainete puhul võib hinnata annust kogumismahuti kaalumise teel enne ja pärast katseaine eemaldamist.

1.4.2.4. *Algkatse (ühe loomaga in vivo nahaärrituvus/-söövitavuskatse)*

Järjestikuste katsete tegemise strateegia kohaselt (vt 1. lisa) on väga soovitatav, et *in vivo* katse sooritataks algselt ühe loomaga.

Kui nimetatud katse tulemused tõendavad, et aine on kirjeldatud menetlust kasutades silma söövitav või tugevalt ärritav, ei ole silma ärritavuse kindlakstegemiseks vaja teha täiendavaid katseid.

1.4.2.5. *Lokaalanesteetikumid*

Lokaalanesteetikume võib kasutada igal üksikjuhul. Kui osakaalu analüüs viitab sellele, et aine võib põhjustada valu, või kui algkatsega tõendatakse, et võib toimuda valulik reaktsioon, võib lokaalanesteetikume kasutada enne katseaine manustamist. Lokaalanesteetikumi liik, kontsentratsioon ja annus tuleks valida hoolikalt, et erinevused katseainele reageerides ei tuleneks selle kasutamisest. Kontrollsilma tuleb samamoodi tuimestada.

1.4.2.6. *Kinnitav katse (in vivo silmade ärritust käsitlev katse täiendavate loomadega)*

Kui söövitavat toimet ei ole algkatsetes täheldatud, tuleks ärritavat või negatiivset reaktsiooni kinnitada kahe muu looma kasutamise abil. Kui algkatsetes täheldatakse tugevat ärritavat mõju, mis viitab võimalikule tugevale (pöördumatule) mõjule kinnitava katse tegemisel, on soovitatav, et kinnitav katse tehtaks järjestikku ühe loomaga korraga, mitte kahte lisalooma korraga mõjutades. Kui teisel loomal esineb söövitavaid või tugevalt ärritavaid mõjusid, siis katset enam ei jätkata. Lisaloomasid võib vaja minna nõrkade või mõõdukate ärritavate reaktsioonide kinnitamiseks.

▼B1.4.2.7. *Jälgimisperiood*

Jälgitakse seni, kuni on võimalik täielikult hinnata vaadeldud mõjude ulatust ja pöörduvust. Katse tuleks lõpetada igal juhul siis, kui loomal on jätkuvalt tugeva valu või stressi tunnused (9). Mõjude pöörduvuse kindlaksmääramiseks tuleks jälgida loomi tavaliselt 21 päeva pärast katseaine manustamist. Kui pöördumus ilmneb enne 21 päeva möödumist, tuleks katse lõpetada sel ajal.

1.4.2.7.1. *Kliinilised vaatlused ja silma reaktsioonide hindamine*

Silmi tuleks jälgida 1, 24, 48 ja 72 tundi pärast katseaine manustamist. Loomi ei uurita pärast seda, kui on saadud lõplikud andmed. Loomad, kellel jätkuvalt esineb tugevat valu või stressi, tuleks viivitamata humaanselt tappa, ning ainet tuleks hinnata vastavalt sellele. Humaanselt tuleks tappa loomad, kellel aine manustamise järel esineb järgmisi silmakahjustusi: sarvkesta perforatsioon või märgatav sarvkesta haavand, kaasa arvatud silmasopislaiend; veri silma eeskambris; hinde 4 sarvkesta läbipaistmatus, mis püsib 48 tunni jooksul; valgusrefleksi puudumine (vikerkesta reaktsioon – hinne 2), mis püsib 72 tunni jooksul; sidekesta haavand; sidekesta või niktatsioonikesta nekroos või armistumine. Seda seetõttu, et sellised kahjustused üldiselt on pöördumatud.

Loomad, kellel ei esine silmakahjustusi, võib tappa mitte varem kui kolm päeva pärast manustamist. Loomi, kellel esinevad kerged või mõõdukad kahjustused, tuleks jälgida seni, kuni kahjustused on selged, või 21 päeva, mil katse lõpetatakse. Jälgitakse 7, 14 ja 21 päeva, et kindlaks määrata kahjustuste seisund ning nende pöördumus või pöördumatus.

Silmade reaktsiooni (sidekest, sarvkest ja vikerkest) hinded tuleks registreerida iga kord, kui looma uuritakse (tabel 1). Kõikidest muudest silmakahjustustest (nt silma sarvkestakiht, värvumine) või kahjulikest süsteemsetest mõjudest tuleks samuti teada anda.

Reaktsioonide uurimist võib hõlbustada binokulaarluubi, pilulambi, biomikroskoobi või muu sobiva seadme kasutamine. Pärast vaatluste registreerimist 24 tunni jooksul võib silmi edasi uurida fluorestseini abil.

Silma reaktsioonide hindamine on tingimata subjektiivne. Silma reaktsiooni hindamise ühtlustamiseks ning katselaboratooriumide ning jälgivate või tõlgendavate isikute abistamiseks on vaja vaatlusi tegevatel isikutel piisavalt tundma õppida kasutatavat hindamissüsteemi (vt tabel allpool).

2. **ANDMED**2.2. **TULEMUSTE HINDAMINE**

Silmaärrituse punkte tuleks hinnata vastavalt kahjustuste laadile ja raskusele ning nende pöörduvusele või pöördumatusele. Üksikud määramised ei esinda aine ärritavate omaduste absoluutset taset, kuna samuti hinnatakse katseaine muid mõjusid. Selle asemel tuleks käsitada üksikuid punkte kontrollväärtustena ja need on tähendusrikkad üksnes siis, kui neid on täielikult kirjeldatud ja kõiki vaatlusi on hinnatud.

▼B3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Põhjendus *in vivo* katse tegemiseks: varasemate katseandmete, sh järjestikuste katsete tegemise strateegia põhjal saadud tulemuste osakaalu analüüs:

- varasematest katsetest saadud asjaomaste andmete kirjeldus;
- katsestrateegia igal etapil saadud andmed;
- *in vitro* katsete kirjeldus, sh menetluste üksikasjad, katse-/võrdlusainetest saadud tulemused;
- *in vivo* nahaärritust/-söövitust uuriva katse, sh saadud tulemuste kirjeldus;
- osakaalu analüüs *in vivo* uurimise sooritamiseks.

Katseaine:

- tunnusandmed (nt CASi number, algupära, puhtus, tuntud lisandid, partii number);
- füüsikaline laad ja füüsikalise-keemilised omadused (nt pH, lenduvus, lahustuvus, stabiilsus, reaktiivsus veega);
- kui tegu on seguga, selle koostis ja koostisosade suhtelised protsendimäärad;
- kui kasutatakse lokaalanesteetikumi, selle nimetus, puhtus, liik, annus ja võimalik koostoime katseainega.

Kandeaine:

- — nimetus, kontsentratsioon (vajaduse korral), kasutatud kogus;
- kandeaine valiku põhjendamine.

Katseloomad:

- kasutatud liigid/liin, põhjendus muude loomade kui albiinoküülivate kasutamiseks;
- iga looma vanus katse alguses;
- mõlemast soost loomade arv katse- ja kontrollrühmas (vajaduse korral);
- üksikute loomade kaalud katse alguses ja lõpus;
- päritolu, elamistingimused, toitumine jne.

Tulemused:

- igal vaatlusel ärritusele punktide andmisel kasutatava meetodi kirjeldus (nt pilulamp, biomikroskoop, fluorestseini);

▼B

- tabeli kujul andmed iga looma ärritavate/söövitavate reaktsioonide kohta igal vaatlusel kuni katselooma kõrvaldamiseni katsest;
- jälgitud ärrituse või söövituse astme ja laadi kirjeldus;
- muude jälgitud silmakahjustuste kirjeldus (nt vaskularisatsioon, silma sarvkestakihi tekkimine, liited, värvumine);
- mujal kui silmas tuvastatud paiksete või süsteemsete kahjulike mõjude ja histopatoloogiliste leidude kirjeldus.

Tulemuste arutelu.

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Katseloomadega tehtud silma ärritust uurivate katsete tulemuste ekstrapolatsioon inimestele on kehtiv üksnes piiratud ulatuses. Paljudel juhtudel on albiinoküülikud silma ärritavatele või söövitavatele ainetele tundlikumad kui inimesed.

Tuleks olla ettevaatlik andmete tõlgendamisel, et välistada sekundaarsest nakkusest tingitud ärritust.

4. VIITED

- 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, R.N. (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) Testing Method B.40 Skin Corrosion.
- 7) Testing method B.4. Acute toxicity: dermal irritation/corrosion.
- 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. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 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, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).
- 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

Tabel 1

SILMAKAHJUSTUSTE HINDAMINE**Sarvkest**

Hägusus: tihedusaste (mõõtmised tuleks teha kõige tihedamas kohas) (*)

Ei esine haavandeid või hägusust	0
Hajutatud või hajusad hägususalad (välja arvatud tavapärase läike kerge tuhmumine); vikerkesta selgelt nähtavad detailid	1
Kergesti märgatav poolläbipaistev ala; vikerkesta kergelt varjatud detailid	2
Pärlnutrine ala; vikerkesta detailid ei ole nähtavad; pupilli suurus on vaevunähtav	3
Läbipaistmatu sarvkest; vikerkest ei eristu läbi hägususe	4

Suurim võimalik punktide arv: 4

MÄRKUSED

(*) Sarvkesta hägususala tuleks mainida.

Vikerkest

Tavaline	0
Selgesti süvenenud kurrud, verepais, turse, mõõdukas liigveresus sarvkesta ümber; või injektsioon; vikerkest reageerib valgusele (pikaldast reaktsiooni peetakse katseaine mõjuks)	1
Verejooks, täielikult hävinud vikerkest või ei reageeri valgusele	2

Suurim võimalik punktide arv: 2

Sidekest

Punarus (viitab laugude ja silmamuna sidekestale, v.a sarv- ja vikerkest)

Tavaline	0
Mõned hüperemilised veresooneid (injekteeritud)	1
Hajunud sügavpunane värvus; üksikuid veresooni ei ole kerge eristada	2
Hajunud tumepunane	3

Suurim võimalik punktide arv: 3

Sidekesta turse

Turse (viitab laugudele ja/või niktatsioonikestale)

Tavaline	0
Mõningane tavapärasest suurem turse	1
Selge turse, laud osaliselt ümber pöördunud	2
Turse, laud poolsuletud	3
Turse, laud rohkem kui poolsuletud	4

Suurim võimalik punktide arv: 4



Lisa

Silma ärritavust ja söövitavust uurivate järjestikuste katsete tegemise strateegia

ÜLDKAALUTLUSED

Mõistlike teaduslike meetodite ja loomade heaolu huvides on oluline vältida loomade tarbetut kasutamist ja vähendada selliste katsete tegemist, mis tõenäoliselt tekitab tõsiseid reaktsioone loomadel. Kogu teavet aine võimaliku silmade ärritavuse/söövitavuse kohta tuleks hinnata enne *in vivo* katse tegemise kaalumist. Võimalik, et on juba olemas piisavalt tõendeid katseaine klassifitseerimiseks silmade ärritavuse või söövitavuse järgi, ja ei ole vaja sooritada katset laboriloomadega. Seetõttu vähendaks osakaaluanalüüsi kasutamine ja järjestikuste katsete tegemise strateegia vajadust *in vivo* katsete tegemise järele, eriti siis, kui aine tõenäoliselt tekitab tõsiseid reaktsioone.

On soovitatav, et kasutataks osakaaluanalüüsi olemasoleva, silmade ärritavust ja söövitavust käsitleva teabe hindamiseks, et kindlaks määrata, kas tuleks teha lisakatseid, v.a *in vivo* silmi uurivad katsed, sellise võime iseloomustamiseks. Kui on vaja teha täiendavaid katseid, on soovitatav, et kasutatakse järjestikuste katsete tegemise strateegiat asjaomaste katseandmete parandamiseks. Ainete puhul, millega ei ole katseid tehtud, tuleks kasutada järjestikuste katsete tegemise strateegiat selliste andmete parandamiseks, mida läheb vaja silmade ärritavuse ja söövitavuse hindamisel. Käesolevas lisas kirjeldatud katsete tegemise strateegia töötati välja OECD seminaril (1). Seda kinnitati ja laiendati hiljem keemiliste ainete mõju inimeste tervisele ja keskkonnale käsitleva integreeritud ohtude harmoneeritud klassifitseerimise süsteemis, nagu see on heaks kiidetud kemikaalikeskonnakomitee ja kemikaalitöörühma 28. ühisistungil 1998. aasta novembris (2).

Kuigi käesolev järjestikuste katsete tegemise strateegia ei ole B.5 katsemeetodi lahutamatu osa, väljendab see soovitatavat lähenemist silmade ärritavuse ja söövitavuse tunnuste kindlaksmääramiseks. Nimetatud lähenemine väljendab nii head tava kui ka eetilist võrdluspunkti *in vivo* silmade ärritust ja söövitust uurivate katsete tegemise kohta. Katsemeetod annab juhiseid *in vivo* katse sooritamiseks ja esitab kokkuvõtte teguritest, mida käsitletakse enne katse alustamist. Järjestikuste katsete tegemise strateegia on lähenemine katseaine silmade ärritavus- ja söövitavusomadusi käsitlevate olemasolevate andmete hindamisele ning mitmetasandiline lähenemine selliste asjaomaste andmete tekitamisele, mille suhtes on vaja teha täiendavaid katseid või mille suhtes ei ole tehtud katseid. Strateegia hõlmab esmalt valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* või *ex vivo* katsete ja seejärel katsemeetodi B.4 sooritamist (nahaärritus/-söövitust uurivad katsed) teatavatel tingimustel (3, 4).

ETAPIVIHILISE KATSETE TEGEMISE STRATEEGIA KIRJELDUS

Enne katse sooritamist järjestikuste katsete tegemise strateegia osana (joonis) tuleks hinnata kogu kättesaadavat teavet *in vivo* silmi uurivate katsete tegemise vajaduse kindlaksmääramiseks. Kuigi üksikute parameetrite hindamisel võib saada märkimisväärset teavet (nt äärmine pH-väärtus), tuleks võtta arvesse olemasolev teave tervenisti. Kõiki kõnealuse aine ja selle analoogide mõjusid käsitlevaid andmeid tuleks hinnata, tehes otsuse osakaalu kohta, ja esitada selle otsuse kohta põhjendus. Esmalt rõhutatakse inimestelt ja loomadelt varem saadud, ainet käsitlevaid andmeid ja seejärel *in vitro* või *ex vivo* katsete tegemise tulemusi. Söövitavaid aineid käsitlevaid *in vivo* katseid tuleks võimaluse korral vältida. Katsete tegemise strateegias võetakse arvesse järgmiseid tegureid.

▼B

Inimestelt ja loomadelt varem saadud andmete hindamine (1. etapp). Inimestelt varem saadud andmeid, nt kliinilised või töökeskkonna uuringud ning juhtumia-ruanded, ja/või loomadega tehtud silmi uurivaid katseid käsitlevaid andmeid tuleks võtta arvesse esmalt, kuna need annavad sellist teavet, mis on vahetult seotud silmadele mõjumisega. Seejärel tuleks hinnata inimesi ja/või loomi uurivatest katsetest kättesaadavaid andmeid, mis uurivad naha söövitust/ärritust. Loomadele ei saa silma manustada aineid, mis on teatavasti silmi söövitavad või tugevalt ärritavad, ega aineid, millel on nahka söövitav või ärritav toime, sest selliseid aineid tuleks pidada samuti silmi söövitavateks ja/või ärritavateks. Aineid, mille kohta on varem tehtud silmi uurivatest katsetest piisavalt tõendeid, et need ei ole söövitavad ega ärritavad, ei tohiks samuti kasutada *in vivo* silmi uurivates katsetes.

Struktuur-aktiivsusanalüüs (SAR) (2. etapp). Struktuuriliselt samalaadsete ainetega tehtud katsete tulemusi tuleks võimaluse korral arvesse võtta. Kui struktuuriliselt samalaadsete ainete või selliste ainete segude kohta on olemas piisavalt inimestelt ja/või loomadelt saadud andmeid, mis viitavad nende silmi söövitavale/ärritavale mõjule, saame eeldada, et hinnatav katseaine põhjustab samu reaktsioone. Sellistel juhtudel ei ole vaja katseainet uurida. Negatiivsed tulemused struktuuriliselt samalaadsete ainete või selliste ainete segudega tehtud katsete kohta ei anna piisavalt tõendeid aine mitteärritavuse/mittesöövitavuse kohta järjestikuste katsete tegemise strateegia alusel. Valideeritud ja heakskiidetud struktuur-aktiivsusanalüüsi abil tuleks kindlaks teha nii naha kui ka silmade söövitavus ja ärritus.

Füüsikalise-keemilised omadused ja keemiline reaktiivsus (3. etapp). Ained, mille äärmine pH-väärtus on näiteks $\leq 2,0$ ja $\geq 11,5$, võivad avaldada tõsist paikset mõju. Kui äärmine pH-väärtus on aluseks aine silmade söövitavuse või ärritavuse kindlakstegemiseks, siis võib samuti võtta arvesse happe-/alusreservi (või puhverdusvõimet) (5, 6). Kui puhverdusvõime viitab sellele, et aine ei või olla silmi söövitav, siis tuleks selle kinnitamiseks teha lisakatse, soovitatavalt valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* või *ex vivo* katsete abil (vt 5. ja 6. etapp).

Muu olemasoleva teabe arvessevõtmine (4. etapp). Kogu süsteemset nahakaudset mürgisust käsitlevat kättesaadavat teavet tuleks hinnata igal etapil. Samuti tuleks arvesse võtta katseaine ägedat nahakaudset mürgisust. Kui on tõendatud, et katseaine on väga mürgine naha kaudu, siis seda ei või silmas katsetada. Kuigi ägeda nahakaudse mürgisuse ja silmade ärrituse/söövituse vahel ei ole tingimata seost, võib eeldada, et kui aine on naha kaudu väga mürgine, võib see samuti olla väga mürgine silma pannes. Selliseid andmeid võib samuti arvesse võtta 2. ja 3. etapil.

In vitro või ex vivo katsete tulemused (5. ja 6. etapp). Aineid, mis on näidanud söövitavaid või tugevalt ärritavaid omadusi valideeritud ja heakskiidetud *in vitro* või *ex vivo* katses (7, 8), mis on valideeritud ja heakskiidetud spetsiaalselt silmade või naha ärrituse/söövituse hindamiseks, ei ole vaja katsetada loomade peal. Võib eeldada, et sellistel ainetel on sarnased tõsised mõjud *in vivo*. Kui valideeritud ja heakskiidetud *in vitro/ex vivo* katsed ei ole kättesaadavad, tuleks vahele jätta 5. ja 6. etapp ning liikuda otse etappi 7.

Aine in vivo nahakaudse ärritavuse või söövitavuse hindamine (7. etapp). Kui ei ole piisavalt tõendeid selle kohta, millega teha lõplik osakaaluanalüüs aine võimaliku silmade ärritavuse/söövitavuse kohta, mis põhineb eespool nimetatud katsetest saadud andmetel, siis esmalt hinnatakse *in vivo* nahaärritavuse/-söövitavuse võimet, kasutades katsemeetodit B.4 (4) ja selle lisa (9). Kui on tõendatud, et aine võib tekitada söövitust või tugevaid nahaärritusi, tuleks seda pidada söövitavaks silmaärritust tekitavaks aineks, välja arvatud juhul, kui teave toetab alternatiivset järeldust. Seega ei ole vaja sooritada *in vivo* silmi uurivat katset. Kui aine ei ole nahka söövitav ega tugevalt ärritav, siis tuleks sooritada *in vivo* silmi uuriv katse.

▼B

In vivo katse küülikutega (8. ja 9. etapp). In vivo silmi uurivad katsed peaksid algama algkatsega, kus kasutatakse ühte looma. Kui nimetatud katse tulemused tõendavad, et aine on silma söövitav või tugevalt ärritav kirjeldatud menetlust kasutades, ei ole vaja teha täiendavaid katseid. Kui nimetatud katsest ei ilmne mis tahes söövitavad või tugevalt ärritavad mõjud, tehakse kinnitav katse kahe lisaloomaga.

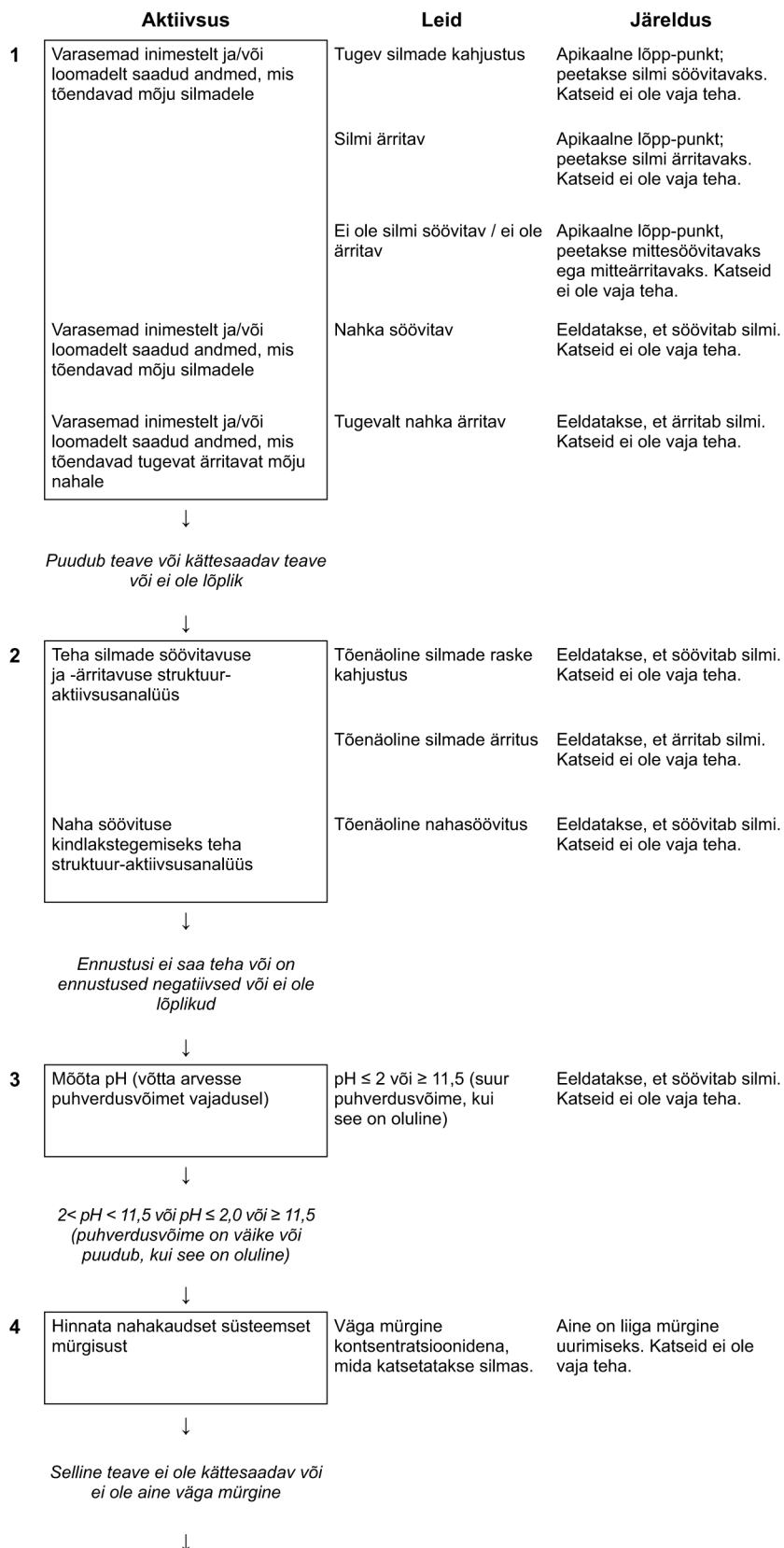
VIITED

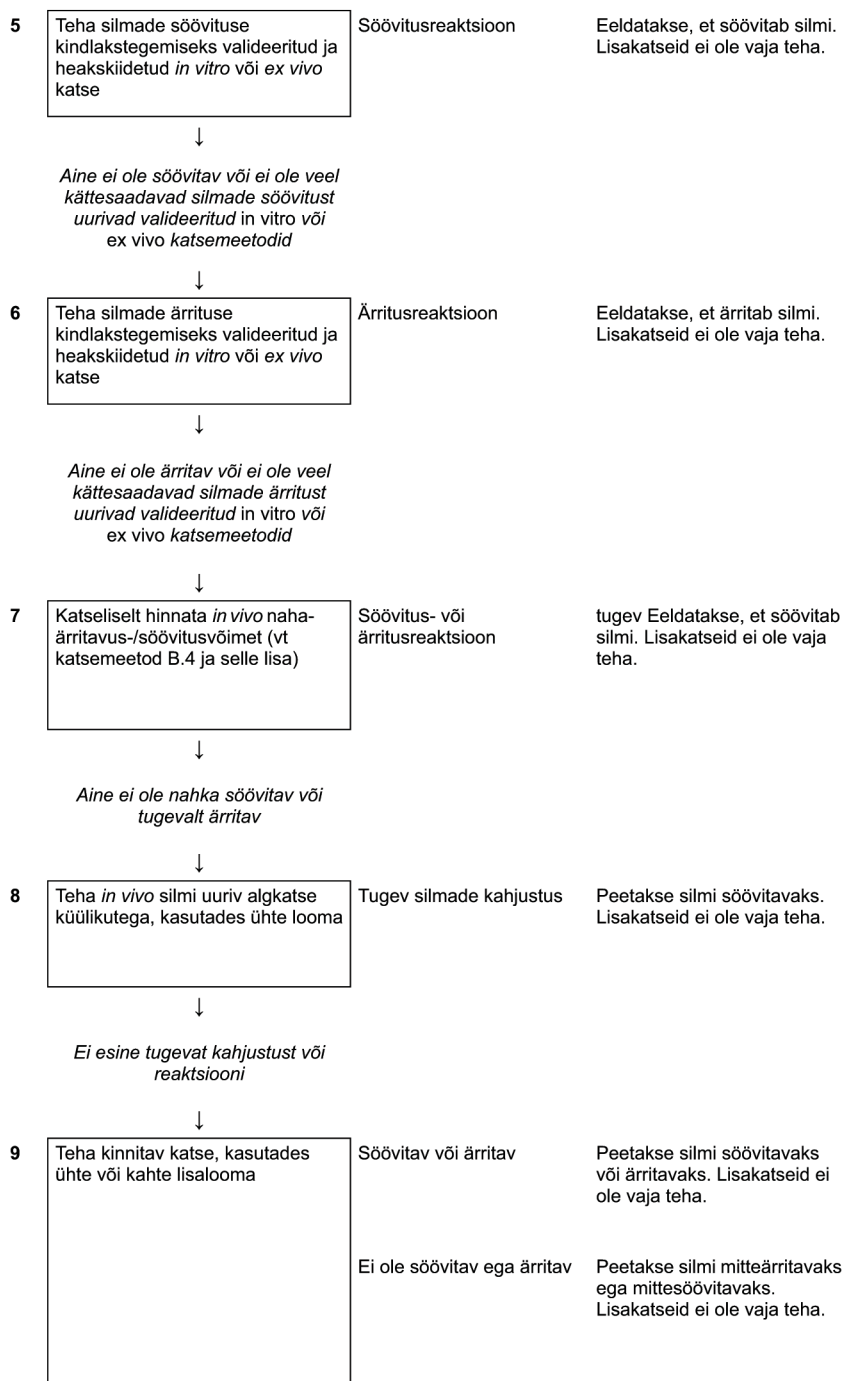
- 1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).
- 2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Qass/HCL6.htm>).
- 3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. *ATLA* 27, 161–177.
- 4) Testing method B.4. Acute Toxicity: dermal irritation/corrosion.
- 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) Testing Method B.40 Skin Corrosion.
- 9) Annex to Testing method B.4: A Sequential Testing Strategy for Skin Irritation and Corrosion.



Joonis

Silmade ärritust/söövitust käsitlevate katsete ja hindamise strateegia



▼ B

▼B**B.6. NAHA SENSIBILISEERIMINE****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS***Märkused*

Katsete tundlikkust ja võimet tuvastada inimeste naha võimalikke sensibiliseerijaid loetakse inimese tervisega seotud toksilisuse liigitamise seisukohalt oluliseks.

Ei ole olemas uurimismeetodit, mis identifitseeriks adekvaatselt kõik ained, mis võivad inimese nahka sensibiliseerida ja mis sobiks kõikide ainete puhul.

Katse valimisel tuleb kaaluda aine füüsikalisi omadusi, sealhulgas aine võimet tungida läbi naha.

Välja on töötatud kahte liiki katsed, milles kasutatakse merisigu: abiainega katsed, milles võimendatakse allergiaseisundit sellega, et uuritavat ainet lahustatakse või suspendeeritakse Freundi täielikus abiaines (*Freund's Complete Adjuvant* – FCA), ja abiaineteta katsed.

Abiainega katsed on tõenäoliselt konkreetse aine võimaliku nahka sensibiliseeriva toime ennustamisel täpsemad kui need meetodid, mis ei kasuta Freundi täielikku abiainet, ning seega tuleks selliseid meetodeid eelistada.

Merisigade maksimeerimise katse (GPMT) on laialdaselt kasutatud abiainega katse. Olgugi, et on olemas mitmeid meetodeid, millega on võimalik tuvastada aine potentsiaali kutsuda esile naha sensibiliseeriv reaktsioon, loetakse GPMT katset eelistatud abiainega katseks.

Paljude keemiliste ainete klasside puhul peetakse abiaineteta katseid (millest eelistatakse Buehleri katset) vähem tundlikuks.

Teatavatel juhtudel võib Buehleri katse valimine olla põhjendatud, kuna selles katstes manustatakse aine paiksest, mitte nahasisese süstimise teel nagu GPMT puhul. Buehleri katse kasutamist tuleks teaduslikult põhjendada.

Käesolevas meetodis kirjeldatakse GPMTd ja Buehleri katset. Kasutada võib ka teisi meetodeid tingimusel, et need on hästi valideeritud ja teaduslikult põhjendatud.

Kui tunnustatud sõelkatsega saadakse positiivne tulemus, võib uuritava aine määrata võimalikuks sensibiliseerijaks ning täiendava meriseakatse tegemine ei pruugi olla vajalik. Kui sellisel katsel on siiski negatiivne tulemus, tuleb meriseakatse teha käesolevas uurimismeetodis kirjeldatud korras.

Vt ka üldise sissejuhatus B osa.

▼B

1.2. MÕISTED

Naha sensibiliseerimine – (allergiline kontaktne dermatiit) on mingi aine poolt põhjustatud immunoloogiliselt vahendatud nahareaktsioon. Inimestel võib vastureaktsiooniks olla sügelemine, punetus, paistetust, paapulid, vesivillid või nende kombinatsioon. Teiste liikide puhul võivad reaktsioonid erineda ning esineda võib ainult punetust ja paistetust.

Induktsioonkokkupuude – katsealuse kokkupuude uuritava ainega, mille eesmärk on kutsuda esile ülitundlik seisund.

Induktsiooniperiood – pärast induktsioonkokkupuudet vähemalt nädal aega kestev periood, mille ajal võib kujuneda ülitundlik seisund.

Allergilise reaktsiooni esile kutsuv kokkupuude – eelnevalt käsitletud katsealuse kokkupuude uuritava ainega pärast induktsiooniperioodi selleks, et määrata kindlaks, kas katsealune reageerib ülitundlikult.

1.3. VÕRDLUSMATERJAL

Kasutatud uurimismeetodi tundlikkust ja usaldusväärsust tuleks hinnata kord kuue kuu jooksul, kasutades selleks aineid, mille puhul on teada, et neil on nõrga või keskmise toimega nahka sensibiliseerivad omadused.

Nõuetekohaselt tehtud abiainega katses peaks eeldatavasti reageerima vähemalt 30 % ja abiaineteta katses vähemalt 15 % nõrga või keskmise toimega sensibiliseerijat.

Eelistatakse järgmisi aineid:

CASi number	EINECSI number	EINECSI nimed	Üldnimetused
101-86-0	202-983-3	α -heksüülkaneelaldehüüd	α -heksüülkaneelaldehüüd
149-30-4	205-736-8	bensotiasool-2-tiool (merkaptobensotiasool)	kaptaks
94-07-7	202-303-5	bensokaiin	nordkaiin

Teatavas olukorras võib piisavate põhjenduste korral kasutada ka teisi eespool nimetatud kriteeriumidele vastavaid võrdlusaineid.

1.4. UURIMISMEETODI PÕHIMÕTE

Katseloomad puutuvad uuritava ainega esimest korda kokku nahasisese süstimise ja/või nahale määrimise kaudu (induktsioonkokkupuude). Pärast 10–14päevast puhkeaega (induktsiooniperioodi), mille jooksul võib välja kujuneda immuunsusreaktsioon, puutuvad loomad kokku nakatumist esile kutsuva doosiga. Katseloomade naha reaktsiooni määra ja ulatust võrreldakse võrdlusloomade omaga, kes saavad induktsiooni ajal platseeboravi ning kellele seejärel manustatakse nakatumist esile kutsuv doos.

1.5. UURIMISMEETODI KIRJELDUS

Kui uuritava aine eemaldamist peetakse vajalikuks, tuleks seda teha vee või sobiva lahustiga, ilma et see muudaks olemasolevat reaktsiooni või kahjustaks naha pinda.

▼B1.5.1. *Merisigade maksimeerimise katse (GPMT)*

1.5.1.1. Valmistised

Terveid albiinomerisigu harjutatakse laboritingimustega vähemalt viie päeva jooksul enne katse tegemist. Enne katse tegemist jagatakse loomad juhuslikkuse alusel katserühmadesse. Karvad eemaldatakse sõltuvalt kasutatavast uurimismeetodist lõikamise, raseerimise või vajaduse korral keemilise depilatsiooni teel. Tuleb olla ettevaatlik, et vältida naha hõõrdumist. Loomi kaalutakse enne katse algust ning katse lõpus.

1.5.1.2. Katsetingimused

1.5.1.2.1. Katseloomad

Katseloomadena kasutatakse üldkasutatavate albiinomerisigade laboratoorseid aretusliine.

1.5.1.2.2. Arv ja sugu

Kasutada võib isas- ja/või emasloomi. Kui kasutatakse emasloomi, peaksid nad olema nullpaarid ja nad ei tohiks olla tiined.

Katserühmas on vähemalt kümme looma ning võrdlusrühmas vähemalt viis looma. Kui katserühmas ja võrdlusrühmas on kasutatud vastavalt vähem kui 20 ja kümnet merisiga ning kui ei ole võimalik järeldada, et uuritav aine on sensibilsaator, soovitatakse tungivalt täiendavate loomad uurimist, et kokku oleks vähemalt 20 katse- ja kümme võrdluslooma.

1.5.1.2.3. Doositasemed

Uuritava aine kontsentratsioon peaks iga induksioonkokkupuute kohta olema süsteemselt hästi talutav ning kasutada tuleks kõrgeimat kerget kuni keskmist nahaärritust tekitavat kontsentratsiooni. Nakatumist esile kutsuva doosi puhul kasutatav kontsentratsioon peaks olema suurim ärritust mitte esile kutsuv doos. Vajaduse korral võib vajalikud kontsentratsioonid määrata kindlaks kahe või kolme loomaga tehtud prooviuuringute põhjal. Sellisel juhul tuleks kaaluda selliste loomade kasutamist, kellele on ainet manustatud FCA abil.

1.5.1.3. Katse käik

1.5.1.3.1. Induksioon

Katserühma 0-päev

Abaluude piirkonda, kust on eemaldatud karvad, süstitakse naha alla 3×2 korda 0,1 ml selliselt, et kolm süsti tehakse keskjoonest vasakule ja kolm keskjoonest paremale.

Injektsioon 1: 1:1 segu (v/v) FCAst ja veest või füsioloogilisest keedusoolalahusest

Injektsioon 2: valitud kontsentratsiooniga uuritav aine sobivas vehiikulis

Injektsioon 3: valitud kontsentratsiooniga uuritav aine 1:1 segus (v/v) FCAst ja veest või füsioloogilisest keedusoolalahusest

Injektsioonis 3 lahustatakse vees lahustuvad ained vesifaasis enne FCAga segamist. Rasvades lahustuvad või lahustumatud ained suspendeeritakse FCAs enne vesifaasiga segamist. Uuritava aine lõppkontsentratsioon peab olema võrdne sellega, mida on kasutatud injektsioonis 2.

▼B

Injektsioonid 1 ja 2 tehakse lähestikku ning peale kõige lähemale, samal ajal kui injektsioon 3 tehakse piirkonna kõige tagapoolsemasse osasse.

Võrdlusrühma 0-päev

3 × 2 korda 0,1 ml süstitakse naha alla samadesse kohtadesse kui katseloomade puhul.

Injektsioon 1: 1:1 segu (v/v) FCAst ja veest või füsioloogilistest keedusoolalahustest

Injektsioon 2: lahjendamata vehiikel

Injektsioon 3: 50 %line w/v segu vehiikelit FCA ja vee või füsioloogilise keedusoolalahuse segus 1:1 (v/v).

Katse- ja võrdlusrühma 5.–7. päev

Kui aine ei ärrita nahka, manustatakse katsepinda ligikaudu 24 tundi enne paikset induktsioonkokkupuudet ja pärast karvade lõikamist ja/või raseerimist 0,5 ml 10 %list naatriumlaaurüülsulfaati vaseliinis kohaliku ärrituse tekitamiseks.

Katserühma 6.–8. päev

Katsepiirkond puhastatakse uuesti karvadest. Sobivas vehiikelis oleva uuritava ainega täielikult küllastatud filterpaber (2 × 4 cm) asetatakse katsepiirkonnale ning kaetakse 48 tunniks oklusioonmähisega. Vehiikeli valikut tuleb põhjendada. Tahked ained pulbristatakse peeneks ja lisatakse sobivasse vehiikelisse. Vedelikke võib kasutada vajaduse korral lahjendamata kujul.

Võrdlusrühma 6.–8. päev

Katsepiirkond puhastatakse uuesti karvadest. Vehiikel asetatakse samal viisil uuritava ainega katsepiirkonnale ja kaetakse 48 tunniks oklusioonmähisega.

1.5.1.3.2. Nakatumise esilekutsumine

Katse- ja võrdlusrühma 20.–22. päev

Katserühma ja võrdlusrühma loomade küljed puhastatakse karvadest. Uuritava ainega immutatud lapp või uuritavat ainet sisaldav nõu pannakse looma ühele küljele ja vajaduse korral võib teisele küljele panna vehiikeliga immutatud lapi või seda sisaldava nõu. Lappe hoitakse oklusioonmähisega 24 tundi naha vastas.

1.5.1.3.3. Vaatlus ja hindamine: katse- ja võrdlusrühm

— Umbes 21 tundi pärast lapi äravõtmist nakatatud ala puhastatakse, pügatakse ja/või raseeritakse ning vajaduse korral depileeritakse.

— Umbes 3 tundi hiljem (umbes 48 tundi pärast nakatumise esilekutsumise alustamist) vaadeldakse naha reaktsiooni ning see registreeritakse liites esitatud hindamisskaala põhjal.

— Umbes 24 tundi pärast vaatlust tehakse teine vaatlus (72 tunni pärast) ning tulemused märgitakse üles.

Soovitav on hinnata katse tulemusi pimemeetodiga.

Kui esimese nakatumise esile kutsuva katse tulemusi on vaja täpsustada, tuleks kaaluda vajaduse korral uue võrdlusrühmaga teise nakatumise esile kutsuva katse (st taasnakatumise katse) tegemist umbes nädal pärast esimest katset. Taasnakatumise katse võib teha ka esialgse võrdlusrühmaga.

▼B

Vaadelda tuleks kõiki nahareaktsioone ja ebatavalisi leidusid, sealhulgas induktsioonist ja nakatumise esilekutsumisest tulenevaid süsteemseid reaktsioone, ja need tuleks üles märkida Magnussoni-/Klingmani (vt liidet) hindamiskaala alusel. Muude toimingute puhul, nt histopatoloogiline uuring, võib küsitavate mõjude täpsustamiseks mõõta nahavoldi paksust.

1.5.2. *Buehleri katse*

1.5.2.1. Valmistised

Terveid albiinomerisigu harjutatakse laboritingimustega vähemalt viie päeva jooksul enne katse tegemist. Enne katse tegemist jagatakse loomad juhuslikkuse alusel katserühmadesse. Karvad eemaldatakse sõltuvalt kasutatavast uurimismeetodist lõikamise, raseerimise või vajaduse korral keemilise depilatsiooni teel. Tuleb olla ettevaatlik, et vältida naha hõõrdumist. Loomi kaalutakse enne katse algust ning katse lõpus.

1.5.2.2. Katsetingimused

1.5.2.2.1. Katseloomad

Katseloomadena kasutatakse üldkasutatavate albiinomerisigade laboratoorseid aretusliine.

1.5.2.2.2. Arv ja sugu

Kasutada võib isaseid ja/või emaseid loomi. Kui kasutatakse emasloomi, peaksid nad olema nullpaarid ja nad ei tohiks olla tiined.

Katserühmas on vähemalt 20 looma ning võrdlusrühmas vähemalt kümme looma.

1.5.2.2.3. Doositasemed

Uuritava aine kontsentratsioon iga induktsioonkokkupuute kohta peaks olema kõrgeim kontsentratsioon, mis kutsub esile kerge, kuid mitte ülemäärase ärrituse. Nakatumist esile kutsuva doosi puhul kasutatav kontsentratsioon peaks olema suurim ärritust mitte esile kutsuv doos. Vajaduse korral võib vajalikud kontsentratsioonid määrata kindlaks kahe või kolme loomaga tehtava prooviuuringute põhjal.

Vees lahustuvate uuritavate ainete puhul on vehiikelina asjakohane kasutada vett või lahjendatud mitteärritavat pindaktiivse aine lahust. Teiste uuritavate ainete vehiikeliks sobib induktsioonkokkupuute 80 %line etanooli ja vee lahus ning nakatumise esilekutsumise puhul atsetoon.

1.5.2.3. Analüüsi käik

1.5.2.3.1. Induktsioon

Katserühma 0-päev

Üks külg puhastatakse korralikult karvadest. Katselapp peab olema sobivas vehiikelis uuritava ainega põhjalikult immutatud (vehiekeli valikut tuleks põhjendada; vedelaid uuritavaid aineid võib vajaduse korral kasutada lahjendamata kujul).

Katselapid pannakse katsepiirkonda ning hoitakse kuus tundi oklusioonlapi või uuritavat ainet sisaldava nõu ja sobiva mähi-sega naha peal.

▼B

Katselapid peavad olema oklusiivsed. Kasutamiseks sobib umbes 4–6 cm² suurune puuvillalapike ning see võib olla ümmargune või kandiline. Oklusiooni tagamiseks soovitatakse sobivat kinnitusemehhanismi. Mähise kasutamisel võib olla vaja täiendavat kokkupuudet.

Võrdlusrühma 0-päev

Üks külj puhastatakse korralikult karvadest. Vehiikel asetatakse katsepinnale samal viisil kui katserühma puhul. Katselappe hoitakse kuus tundi oklusioonlapi või uuritavat ainet sisaldava nõuga ja sobiva mähisega naha peal. Kui on võimalik tõestada, et platseeboravi saavat võrdlusrühma ei ole vaja, võib kasutada varem kasutamata võrdlusrühma.

Katse- ja võrdlusrühma 6.–8. ja 13.–15. päev

Samas katsepiirkonnas, 6.–8. ja siis 13.–15. päevaga samal küljel viiakse läbi samasugune kokkupuude nagu 0-päeval (vajaduse korral puhastatakse nahk karvadest).

1.5.2.3.2. Nakatumise esilekutsumine

Katse- ja võrdlusrühma 27.–29. päev

Katserühma ja võrdlusrühma loomade külj, mis ei ole seni uuritava ainega kokkupuutes olnud, puhastatakse karvadest. Oklusioonlapp või nõu, milles on piisaval määral kõrgeima mitteärritava kontsentratsiooniga uuritavat ainet, pannakse katse- ja võrdlusrühma loomade selle külje tagaosale, millel ei ole veel katset tehtud.

Vajaduse korral pannakse katse- ja võrdlusrühma loomade töötlemata külje tagaosale vehiikelit sisaldav oklusioonlapp või -nõu. Neid lappe või nõusid hoitakse sobiva mähisega kuus tundi naha vastas.

1.5.2.3.3. Vaatlus ja hindamine

- Umbes 21 tundi pärast lapi äravõtmist puhastatakse karvadest ala, millel nakatumine esile kutsuti.
- Umbes kolm tundi hiljem (umbes 30 tundi pärast nakatumist esile kutsuva lapi katsepiirkonda asetamist) vaadeldakse nahareaktioone ning need märgitakse üles vastavalt liites esitatud hindamisskaalale.
- Umbes 24 tundi pärast 30 tundi kestnud vaatlusperioodi (umbes 54 tundi pärast nakatumist esile kutsuva lapi nahapinnale asetamist) vaadeldakse nahareaktioone uuesti ning tulemused märgitakse üles.

Katse tulemusi tuleks hinnata soovitatavalt pimemeetodiga.

Kui esimese nakatumist esile kutsuva katse tulemusi on vaja täpsustada, tuleks kaaluda vajaduse korral uue võrdlusrühmaga teise nakatumist esile kutsuva katse (st taasnakatumise katse) tegemist umbes nädal pärast esimest katset. Taasnakatumise katse võib teha ka esialgse võrdlusrühmaga.

▼B

Kõiki nahareaktsioone ja ebatavalisi leidusid, sealhulgas induktsioonist ja nakatumise esilekutsumisest tulenevaid süsteemseid mõjusid, tuleks vaadelda ja need tuleks üles märkida Magnussoni/Klingmani (vt liidet) hindamiskaala alusel. Muude toimingute puhul, nt histopatoloogiline uuring, võib küsitavate mõjude täpsustamiseks mõõta nahavoldi paksust.

2. **ANDMED (GPMT ja Buehleri katse)**

Andmed tuleks esitada kokkuvõtvalt tabelis, milles oleks iga looma kohta märgitud kõikidel vaatlustel täheldatud nahareaktsioonid.

3. **ARUANDLUS (GPMT ja Buehleri katse)**

Kui enne merisigade maksimeerimise katset tehakse sõeluuring, tuleb koos katse- ja võrdlusrühmaga saadud tulemustega esitada ka katse (nt paikne lümfisõlmede uuring (LLNA), hiire kõrva turse määramise katse (MEST)) kirjeldus või viide sellele, sealhulgas meetodi üksikasjad.

Katsearuanne (GMPT ja Buehleri katse)

Katsearuanne peab võimaluse korral sisaldama järgmist teavet.

Katseloomad:

- kasutatud merisea aretusliin;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, toit jne;
- iga looma kaal katse alguses.

Katsetingimused:

- lapi asetuskoha ettevalmistamise meetod;
- lapi materjali ja lappide asetamise meetodi üksikasjad;
- prooviuuringu tulemused ning järeldused katses kasutatavate induktsiooni- ja nakatumist esile kutsuvate kontsentratsioonide kohta;
- uuritava aine ettevalmistamise, kasutamise ja eemaldamise üksikasjad;
- vehiikeli valiku põhjendus;
- induktsioonkokkupuutes ja nakatumise esilekutsumisel kasutatud vehiikeli ja uuritava aine kontsentratsioonid ning induktsiooni ja nakatumise esilekutsumise ajal kasutatud aine kogumäär.

Tulemused:

- kokkuvõtte kõige värskemate tundlikkuse ja usaldusväärsuse kontrollide tulemuste kohta (vt 1.3), sealhulgas teave kasutatud aine, kontsentratsiooni ja vehiikeli kohta;

▼B

- iga looma kohta, sealhulgas hindamissüsteem;
- täheldatud toime iseärasuse ja määra kirjeldus;
- histopatoloogilised leiud.

Tulemuste üle arutlemine.

Järeldused.

4. **VIITED**

Käesolev meetod on analoogne meetodiga OECD TG 406.

▼B*Liide**TABEL*

Magnussoni/Kligmani hindamiskaala mähiskatsega esilekutsutava reaktsiooni hindamiseks

0 = nähtavat muutust ei esine

1 = juhuslik või laiguline punetus

2 = mõõdukas ja kokkuvalgunud punetus

3 = intensiivne punetus ja paistetus

▼M4

B.7. SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 28-PÄEVANE UURING NÄRILISTEL

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 407 (2008). Esialgne TG 407 võeti vastu 1981. aastal. 1995. aastal võeti vastu läbivaadatud versioon, et saada uuringus kasutatud katseloomalt lisateavet, eelkõige neurotoksilisuse ja immuuntoksilisuse kohta.
2. OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et söeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekreetsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid (8). Selle tegevuse üks osa on olemasoleva OECD juhendi „Suukaudse kordusdoosi toksilisuse 28-päevane uuring närilistel” (TG 407) ajakohastamine selliste näitajate lisamiseks, millega saab määrata uuritavate kemikaalide sisesekreetsioonisüsteemi kahjustavat toimet. Ajakohastamiseks viidi ellu laialdane rahvusvaheline programm, et katsetada täiendavate näitajate asjakohasust ja kasutatavust, osutatud näitajate sobivust kemikaalide puhul, millel on (anti)östrogeenne, (anti)androgeenne ja (anti)türoidne toime, laborisest ja laboritevahelist korratavust ning uute näitajate ja varasema TG 407 kohaselt nõutud näitajate vastastikust mõju. Niimoodi saadud suur hulk andmeid on kokku võetud põhjalikus OECD aruandes (9), milles andmeid on ka üksikasjalikult hinnatud. Käesolev ajakohastatud katsejuhend B.7 (mis on samaväärne katsejuhendiga TG 407) on välja töötatud rahvusvahelise uurimisprogrammi käigus saadud tulemuste ja kogemuste alusel. Käesolev katsemeetod võimaldab seada teatavad endokriinsüsteemi kaudu põhjustatavad toimed muude toksikoloogiliste mõjude konteksti.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

3. Kemikaali toksiliste omaduste kindlaksmääramisel ja hindamisel võib teha suukaudse mürgisuse katseid kordusdoosidega pärast seda, kui on saadud esialgne teave mürgisuse kohta ägeda mürgisuse katsetest. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on uurida mürgisust, mille põhjuseks on väga mitmesuguste võimalikele mürgisuse sihtsüsteemidele avaldatav toime. Sellega saadakse teavet võimalike terviseohtude kohta, mis võivad tekkida korduval kokkupuutel suhteliselt piiratud ajavahemiku jooksul ja mis hõlmavad mõju närvisüsteemile, immuunsüsteemile ja sisesekreetsioonisüsteemile. Seoses nende konkreetsete eesmärkidega peaks käesoleva meetodiga olema võimalik kindlaks teha võimalikke neurotoksilisi kemikaale, mida tuleb sellest aspektist edaspidi veel süvendatult uurida, ja kemikaale, mis mõjutavad kilpnäärme talitlust. Meetodiga võib saada andmeid ka kemikaalide kohta, mis mõjutavad mees- ja/või naissuguelundeid noortel täiskasvanud loomadel, samuti nende kemikaalide immunoloogilise toime kohta.
4. Käesoleva katsemeetodiga B.7 saadud tulemusi tuleks kasutada ohtude kindlakstegemiseks ja riskide hindamiseks. Sisesekreetsioonisüsteemi iseloomustavate näitajate kaudu saadud tulemuste käsitlemisel tuleks arvestada „OECD kontseptuaalset raamistikku sisesekreetsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide katsetamiseks ja hindamiseks” (11). Meetod kujutab endast põhilist kordusdoosi toksilisuse uurimise meetodit, mida võib kasutada kemikaalide korral, mille puhul 90-päevane uuring ei ole põhjendatud (näiteks kui tootmismahd ei ületa teatavat piiri), või pikaajalist katset ettevalmistava uuringuna. Kokkupuute ajavahemik peaks olema 28 päeva.

▼M4

5. Nagu näitas rahvusvaheline programm, mis viidi ellu selliste parameetrite valideerimiseks, mis kõlbaksid uuritava kemikaali võimaliku sisesekreetsioonisüsteemi häiriva mõju kindlakstegemiseks, sõltub käesoleva katsemeetodi B.7 tulemuste kvaliteet tugevasti sellest, kui kogenud on uurimislabor. See kehtib eriti emaslooma suguorganite tsükliliste muutuste histopatoloogilise määramise kohta ning selliste väikeste hormoonsõltuvate organite massi määramise kohta, mida on lahkamisel raske eraldada. On välja töötatud histopatoloogialane juhend (19). Juhend on kättesaadav OECD katsejuhendeid käsitleva avaliku veebisaidi kaudu. Juhendi eesmärk on aidata patoloogidel teha vaatlusi ja aidata suurendada katse tundlikkust. Sisesekreetsioonisüsteemiga seotud toksilisuse kohta saab andmeid mitmesuguste näitajate kaudu, mida määratakse käesoleva katsemeetodiga. Näitajaid, mille kasulikkuse tõendamiseks ei olnud piisavalt andmeid või mille kohta valideerimisel selgus, et nende võime leida sisesekreetsioonisüsteemi kahjustavaid kemikaale on vähe tõendatud, pakutakse vabal valikul kasutatavate näitajatena (vt 2. liide).
6. Valideerimise käigus saadud andmete põhjal tuleb rõhutada, et käesoleva katse tundlikkus ei ole piisav selleks, et teha kindlaks kõik ained, millel on (anti)östrogeenne või (anti)androgeenne toime (9). Käesolevat meetodit ei kasutata eluetapil, mis on sisesekreetsioonisüsteemi mõjutamise suhtes kõige tundlikum. Valideerimisel võimaldas käesolev meetod siiski kindlaks teha aineid, mis nõrgalt või tugevasti mõjutavad kilpnäärme funktsiooni, ning tugeva ja mõõduka endokriinse toimega aineid, mis toimivad östrogeeni või androgeeni retseptorite kaudu, kuid enamikul juhtudest ei võimaldanud meetod kindlaks teha selliseid endokriinse aktiivsusega aineid, mis mõjutavad östrogeeni või androgeeni retseptoreid nõrgalt. Seepärast ei saa seda meetodit pidada endokriinse aktiivsuse leidmise sõeluuringu meetodiks.
7. Järelikult ei saa sellise toimeviisiga seotud mõju puudumist pidada tõendiks, et aine ei mõjuta sisesekreetsioonisüsteemi. Sisesekreetsioonisüsteemi kaudu avalduva mõju puhul ei tohiks aine iseloomustamisel toetuda üksnes käesolevale meetodile, vaid seda meetodit tuleks kasutada tõendite kaalumise lähenemisviisi raames ja aine võimaliku endokriinse aktiivsuse iseloomustamiseks võtta arvesse kõik kemikaali kohta olemas olevad andmed. Seepärast peaks õigusloomealaste otsuste tegemine endokriinse toime kohta (aine iseloomustamine) olema põhjendatud laiaulatuslikul alusel, mitte üksnes käesoleva katsemeetodi abil saadud andmetega.
8. Meetodi kasutamisel arvestatakse, et kõik katsed loomadega peavad vastama loomade hooldamise kohalikele normidele; siin esitatud hoolduse ja kohtlemise kirjeldused on katse tegemise miinimumnõuded ning kui kohalikud eeskirjad on rangemad, tuleb lähtuda kohalikest eeskirjadest. OECD on esitanud loomade humaanse kohtlemise täiendavad juhendid (14).
9. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

10. Uuritav kemikaal manustatakse katseloomade eri rühmadele suu kaudu kord päevas astmeliselt suurenevate doosidena selliselt, et üks rühm saaks 28 päeva jooksul ainult ühte doosi. Manustamisperioodi jooksul jälgitakse loomi iga päev hoolikalt toksilisuse märkide tuvastamiseks. Katse ajal surnud või humaansel viisil surmatud loomad lahatakse ning katse lõppemisel surmatakse humaansel viisil ja lahatakse ka ellujäänud loomad. 28-päevane katse annab teavet korduva suukaudse kokkupuute mõjude kohta ja

▼M4

katsest võib selguda, et on vaja korraldada pikemaid uuringuid. Samuti võib katse anda teavet pikemas katsemeetodis kasutatavate kontsentratsioonide valimise kohta. Käesoleva katsemeetodiga saadud andmed peaksid võimaldama kirjeldada uuritava kemikaali mürgisust, koostada mõju doosist sõltuvuse ja määrata katseloomadele täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsiooni (*No-Observed Adverse Effect Level*, NOAEL).

MEETODI KIRJELDUS**Loomaliigi valimine**

11. Närilistest eelistatakse rotte, kuigi kasutada võib ka muid närilisi. Kui käesolevas katsemeetodis B.7 kirjeldatud näitajaid uuritakse mõne muu närilise-liigiga, tuleb seda üksikasjalikult põhjendada. Kuigi bioloogiliselt on võimalik, et muu liik peaks mürgisele kemikaalile reageerima sarnaselt rotiga, võib väiksemate loomade kasutamisel suureneva tulemuste hajuvus, kuna väikseid organeid on tehniliselt keerukam eraldada. Sisesekretsioonisüsteemi häirivate kemikaalide kindlakstegemise rahvusvahelises valideerimisprogrammis kasutati ainsa liigina rotte. Kasutatakse enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Doseerimisega tuleks alustada võimalikult kohe pärast võõrutamist ja igal juhul enne loomade üheksanädalaseks saamist. Uuringu alguses peaks loomade kehamassi erinevus olema minimaalne ega tohiks ületada $\pm 20\%$ kummastki soost loomade keskmisest kehamassist. Kui suukaudse kordusdoosi uuringule järgneb pikaajaline uuring, tuleks mõlemas uuringus kasutada eelistatult samast aretusliinist ja sama päritoluga loomi.

Pidamis- ja söötmingimused

12. Kogu katse teostus peaks vastama laboriloomade hooldamise kohalikele normidele. Temperatuur katseloomade ruumis peab olema $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30% ja soovitatavalt mitte üle 70% , välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus $50\text{--}60\%$. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavalist labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata. Söödavalikut võib mõjutada vajadus kindlustada sobiva lisasegu lisamine, kui uuritavat kemikaali manustatakse sellisel viisil. Loomi tuleks pidada puurides väikeste samast soost isendite rühmadena; kui see on teaduslikult põhjendatud, võib loomi pidada ka üksikpuurides. Rühmaviisilisel pidamisel ei tohiks puuris olla rohkem kui viis looma.
13. Sööta tuleb korrapäraselt analüüsida saasteainete suhtes. Sööda proov tuleb alles hoida kuni katseprotokolli lõpliku valmimiseni.

Loomade ettevalmistamine

14. Terved noored täiskasvanud loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühma. Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomad märgistatakse individuaalseks eristamiseks ning enne katse alustamist hoitakse neid vähemalt viis päeva puurides, et nad jõuaksid laboritingimustega kohaneda.

Dooside ettevalmistamine

15. Uuritav kemikaal manustatakse sundsöötmisega või koos sööda või joogiveega. Suukaudse manustamise meetod sõltub uuringu eesmärgist ja uuritava kemikaali füüsikalise-keemilistest ja toksiko-kineetilistest omadustest.

▼M4

16. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. On soovitatav, et võimaluse korral kaalutakse esmalt vesilahuse/-suspensiooni kasutamist, seejärel õlilahuse/-suspensiooni (nt maisiõlis) kasutamist ja siis lahustamist mõnes muus võimalikus kandeaines. Kui kandeainena kasutatakse muud ainet peale vee, tuleb teada kandeaine toksilisusega seotud omadusi. Kindlaks tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines.

KATSE KÄIK

Loomade arv ja sugu

17. Igal doositasemel tuleks kasutada vähemalt kümnet looma (viis emas- ja viis isaslooma). Kui plaanitakse vahepealset loomade surmamist, tuleb isendite arvu suurendada vastavalt selle arvu võrra, kui palju loomi kavatakse surmata enne uuringu täielikku lõpetamist. Tuleb kaaluda täiendava kümnest loomast (viis kummastki soost) koosneva lisarühma (edaspidi: „satelliitrühm”) kasutamist kontrollina ja suurima doosi rühmas, et jälgida mürgise toime pöörduvust, püsivust või mürgisuse avaldumist hilinemisega vähemalt 14 päeva jooksul pärast doseerimise lõppu.

Doseerimine

18. Üldiselt tuleks kasutada vähemalt kolme doosi- ja kontrollrühma, kuid kui muude andmete hindamise põhjal ei eeldata ühtegi mõju korduva doosiga 1 000 mg/kg kehamassi kohta päevas, võib teha piirsalduskatse. Kui sobivaid andmeid ei ole, võib kasutatavate dooside kindlaksmääramise hõlbustamiseks teha doosipiirkonna määramise katse (kasutades sama liini ja päritoluga loomi). Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui katserühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet, tuleb võrdlusrühmale manustada kandeainet suurimas kasutatud mahus.

19. Doositaseme valimisel tuleks arvesse võtta kõiki uuritava kemikaali või sellelaadsete kemikaalide toksilisust käsitlevaid ja (toksiko-)kineetilisi andmeid. Kõrgeim doositase tuleks valida nii, et see kutsuks esile toksilise toime, kuid ei põhjustaks surma ega tõsiseid kannatusi. Seejärel tuleks valida aste-astmelt vähenevad doositasemed, et näidata doosi ja toime vahelist seost ning kahjuliku toime puudumist madalaimal doositasemel ehk täheldatava kahjuliku toimeta doositasemel (NOAEL). Alanevate kontsentratsioonide valimisel on sageli parim viis kasutada kahe- kuni neljakordseid vahemikke ja väga suurte kontsentratsioonivahemike (nt üle kümnekordne tegur) kasutamise asemel on parem lisada neljas katserühm.

20. Täheldatava üldise toksilisuse puhul (nt kehamassi vähenemine, mõju maksale, südamele, kopsudele või neerudele jne) või muude muutuste puhul, mille põhjuseks ei tarvitse olla toksiline toime (näiteks isu halvemine, maksa suurenemine), tuleks jälgitavaid mõjusid immuunsüsteemi, närvisüsteemi või sisesekretsioonisüsteemi näitajatele tõlgendada suure ettevaatusega.

Piirsalduskatse

21. Kui käesolevas uuringus kirjeldatud meetodiga ei tuvastata katses päevadoosil vähemalt 1 000 mg/kg kehamassi kohta või uuritava kemikaali protsentuaalselt sama suurel määral (määratud kehamassi alusel) sööda või joogivee kaudu manustamisel märkimisväärset toksilist mõju ja kui toksilisus ei ole samalaadse struktuuriga kemikaalide kohta saadud andmete põhjal ootuspärane, ei loeta täielikku kolme doositasemega uuringut vajalikuks. Võib teha piirsalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

▼ **M4****Dooside manustamine**

22. Loomadele doseeritakse uuritavat kemikaali seitsmel päeval nädalas 28 päeva jooksul. Kui uuritavat kemikaali manustatakse loomadele sundsöötmisega, tuleks seda teha ühe doosi kaupa, kasutades maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Suurim vedelikukogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Maht ei tohiks ületada 1 ml 100 g kehamassi kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, kus võib kasutada mahtu 2 ml 100 g kehamassi kohta. Katsekoguse varieeruvust tuleks vähendada ja reguleerida kontsentratsioone nii, et doosi kogumaht oleks kõikide dooside korral sama; seda ei saa teha ärritavate või söövitavate kemikaalide puhul, mille mõju suurema kontsentratsiooni korral tavaliselt tugevneb.
23. Kemikaalide puhul, mida manustatakse sööda või joogiveega, on oluline tagada, et sisseantavad uuritava kemikaali kogused ei muudaks tavalist toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni söödas (ppm) või püsiva suurusega doosi vastavalt looma kehamassile; tuleb täpsustada, millist võimalust kasutatakse. Kui kemikaali manustatakse sundsöötmisega, tuleks doos anda igal päeval samal ajal ning seda tuleks vajaduse korral kohandada, et säiliks püsiv doositase looma kehamassi suhtes. Kui pärast kordusdoosi uuringut tehakse pikaajaline uuring, tuleks mõlema uuringu puhul kasutada samasugust sööta.

Vaatlused

24. Jälgimise ajavahemik peaks olema 28 päeva. Satelliitühma kuuluvaid loomi, keda vaadeldakse pikema aja jooksul, et teha kindlaks uuritava kemikaali toksilise toime hilinenud ilmnemist, toime püsimist või toimest toibumist, tuleks pidada veel vähemalt 14 päeva ilma uuritavat kemikaali manustamata.
25. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas, soovitatavalt iga kord samal ajal ning võttes arvesse kõige tõenäolisemat aega pärast doseerimist, mille jooksul oodatud mõju peaks olema kõige tugevam. Üles tuleks märkida loomade tervislik seisund. Vähemalt kaks korda päevas tuleks kontrollida, kas loomad on haigestunud või surnud.
26. Kõikide loomade puhul tuleks üksikasjalik kliiniline vaatlus teha enne seda, kui loomale esimest korda uuritavat kemikaali manustatakse (selleks, et loomi oleks võimalik omavahel võrrelda), ning seejärel vähemalt kord nädalas. Need vaatlused tuleks teha väljaspool puuri, selleks ette nähtud kohas ja eelistatavalt iga kord samal kellaajal. Tulemused tuleks hoolikalt üles märkida, kasutades selleks võimaluse korral uurimislabori selgelt kindlaks määratud hindamissüsteeme. Tuleks püüda tagada, et katsetingimused varieeruksid võimalikult vähe ja eelistatult ei tohiks vaatljad olla teadlikud uuritava kemikaali manustamisest. Üles tuleks märkida vähemalt järgmised tunnused: muutused nahal, karvastikus, silmades, limaskestal, eritiste esinemine ning autonoomsed muutused (nt pisaravool, turris karv, pupillide suurus, muutunud hingamine). Samuti tuleks üles märkida muutused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad endaga ümberkäämisele reageerivad, klooniilised või tooniilised liigutused, stereotüübid (nt ülemäärane karvastiku hooldamine, ringiratast keerlemine) või kummaline käitumine (nt enese vigastamine, tagurpidi liikumine) (2).
27. Neljandal kokkupuutenädalal tuleks hinnata sensoorseid reaktsioone eri liiki ärritajatele (2) (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptiivsetele ärritajatele) (3, 4, 5), samuti haardetugevust (6) ja mootorset tegevust (7). Võimalike meetodite täpsemad üksikasjad on esitatud vastavates viidatud dokumentides. Siiski võib kasutada ka muid meetodeid kui need, millele viidatakse.

▼ **M4**

28. Neljanda kokkupuutenädala funktsionaalsed vaatlused võib ära jätta juhul, kui uuring tehakse subkroonilise toksilisuse 90-päevase uuringu eeluuringuna. Sellisel juhul tuleks funktsionaalsed vaatlused teha kõnealuse järeluuringu käigus. Teiselt poolt võivad kordusdoosi uuringu käigus tehtud funktsionaalsete vaatluste andmed hõlbustada järgneva subkroonilise uuringu jaoks doositasemete valimist.
29. Erandkorras võib funktsionaalsed vaatlused ära jätta ka rühmade puhul, kellel esineb toksilisuse märke niisugusel määral, et see oluliselt takistab funktsionaalsete katsete tegemist.
30. Lahkamisel võiks tupeäiete abil määrata kõikide emasloomade innatsükli (valikuline). Sellistest andmetest saadakse teavet innatsükli järgu kohta looma surmamise ajal ja see aitab histoloogiliselt hinnata östrogeenitundlikke kudesid (vt histopatoloogia juhendid (19)).

Kehamass ja sööda/vee tarbimine

31. Kõiki loomi tuleks kaaluda vähemalt kord nädalas. Sööda tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogi-veega, tuleb vee tarbimist samuti mõõta vähemalt kord nädalas.

Hematoloogia

32. Katseperioodi lõpus tuleks teha järgmised hematoloogilised uuringud: hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, retikulotsüütide arv, leukotsüütide üldarv ja eri leukotsüütipopulatsioonide arvud, vereliistakute arv ja vere hüübimisaja/hüübimisvõime mõõtmine. Kui uuritav kemikaal või selle oletatavad metaboliidid on või võivad olla oksüdeerivate omadustega, tuleks teha veel muid määramisi, sealhulgas määrata methemoglobiini kontsentratsioon ja Heini keakesed.
33. Vereproovid tuleks võtta kindlaksmääratud kohast vahetult enne loomade surmamist või selle ajal ja neid tuleks säilitada sobivates tingimustes. Enne surmamist tuleks loomi hoida üks öö söömata ⁽¹⁾.

Kliiniline biokeemia

34. Kliinilised biokeemilised analüüsid peamiste toksiliste mõjude uurimiseks kudedes ja eelkõige toime uurimisel neerudele ja maksale tuleks teha vereproovidega, mis on võetud loomadelt vahetult enne surmamist või selle ajal (välja arvatud loomad, kes leiti suremas ja/või surmati katse ajal). Plasma- või seerumiuringud peavad hõlmama naatriumi, kaaliumi, glükoosi, üldkolesterooli, karbamiidi, kreatiniini, üldvalgu ja albumiini, vähemalt kahe hepatotsellulaarsele toimele osutava ensüümi (näiteksalaniinaminotransferaas, aspartaaminotransferaas, leeliseline fosfataas, γ -glutamüültranspeptidaas, ja glutamaatdehüdrogenaas) ja sapphapete määramist. Muude ensüümide (maksa- või muud ensüümid) ja bilirubiini mõõtmised võivad teataval tingimustel anda kasulikku teavet.
35. Uuringu viimasel nädalal on loomadelt teatava aja jooksul teatava mahuga uriiniproovide kogumise teel võimalik teha järgmisi uriinianalüüse: välimus, ruumala, osmolaalsus või suhteline tihedus, pH, valk, glükoos ja veri/vererakud.

⁽¹⁾ Mitmete seerumi ja plasma, eelkõige glükoosi mõõtmiste korral oleks eelistatav loomadele eelneva öö jooksul süüa anda. Selle peamine põhjendus on see, et söötmise korral oleks tulemuste varieeruvus suurem ning see varjaks raskemini tuvastatava toime ning muudaks tõlgendamise raskeks. Teisest küljest võib öö läbi söömata hoidmine aga häirida loomade tavalist üldist ainevahetust ja eelkõige söödaga manustamise uuringute puhul võib see häirida igapäevast kokkupuudet uuritava kemikaaliga. Kui loomadele ei anta öö jooksul süüa, tuleks uuringu neljandal nädalal tehtud funktsionaalsete vaatluste järel teha kliinilis-biokeemilised määramised.

▼ **M4**

36. Lisaks sellele tuleks kaaluda üldistele koekahjustustele osutavate plasma- või seerumimarkerite uurimist. Muud määramised, mis tuleks teha juhul, kui uuritava kemikaali teadaolevad omadused võivad mõjutada või mõjutavad eeldatavasti sellega seotud metaboliseerimise profiili, hõlmavad kaltsiumi, fosfaadi, triglütseriidide, teatavate hormoonide ja koliinesteraasi määramist. Need on vaja määrata teatud klassi kuuluvate kemikaalide puhul või iga juhtumi puhul eraldi.
37. Kuigi sisesekretsioonisüsteemi näitajate rahvusvahelise evalueerimisega ei õnnestunud näidata kilpnäärmehormoonide (T3, T4) ja TSH määramise selgeid eeliseid, võib siiski olla kasulik hoida alles plasma- ja seerumi-proovid, et määrata T3, T4 ja (soovi korral) TSH, kui on andmeid, et võib esineda mõju ajuripatsi-kilpnäärme süsteemile. Neid proove võib säilitada külmutatult $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures. Hormoonide määramisel võivad hajuvust ja absoluutseid kontsentratsioone mõjutada järgmised tegurid:

- surmamise aeg, kuna hormoonide kontsentratsioonil on ööpäevane muutumise rütm;
- surmamisviis – tuleb vältida loomade tarbetut stressi, mis võib mõjutada hormoonide kontsentratsioone;
- hormoonide määramise testikomplektid, mille standardkõverad võivad olla erinevad.

Usaldusväärsemalt kui hormoonide taseme määramisega saab kilpnääret mõjutavaid kemikaale teha kindlaks histopatoloogilise analüüsiga.

38. Hormoonide määramiseks ette nähtud plasmaproovid tuleb saada enam-vähem ühel kellaajal. T3, T4 ja TSH määramist soovitatakse kaaluda siis, kui kilpnäärmes leitakse histopatoloogilise uuringuga muutusi. Müügilolevate eri testikomplektidega saadakse erinevad hormoonikontsentratsioonide arvvaartused. Järelilikult ei tarvitse olla võimalik esitada kvaliteedinõudeid, mis põhineksid ühesugustel varasematel andmetel. Teise võimalusena peaksid laborid püüdma hoida hajuvuskoeffitsiendid T3 ja T4 puhul allpool 25 ning TSH puhul allpool 35. Kõik kontsentratsioonid esitatakse ühikutes ng/ml.
39. Kui varasemad andmed ei ole piisavad, tuleks kaaluda hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia näitajate määramist enne doseerimise algust või määrata need loomadel, keda ei kasutata katserühmades.

PATOLOOGIA

Täielik lahkamine

40. Kõik uuringus kasutatud loomad läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki avasid, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisaldist. Kõikide loomade (välja arvatud need, kes leitakse surevana ja/või surmatakse uuringu ajal) maks, neerud, neerupealised, munandid, munandimanused, eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega tervikuna, harknääre, põrn, aju ja süda tuleb vajaduse korral puhastada muudest kudedest ja nende märgmass määratakse kuivamise vältimiseks võimalikult kiiresti pärast väljalõikamist. Eesnäärme-kompleksi puhastamisel naaberkudedest tuleb hoolikalt vältida vedelikuga täidetud seemnepõiekestest vigastamist. Teise võimalusena võib seemnepõiekesed ja eesnäärme eraldada ja kaaluda pärast fikseerimist.

▼ M4

41. Lisaks tuleks vajaduse korral ja kuivamise vältimiseks võimalikult kiiresti pärast väljalõikamist kaaluda veel kaks kude: munasarjade paar (märgmass) ja emakas, kaasa arvatud emakakael (juhendid emakakudede eemaldamiseks ja kaalumiseks ettevalmistamiseks on esitatud dokumendis OECD TG 440 (18)).
42. Kilpnäärme massi võib (soovi korral) määrata pärast fikseerimist. Ka siin tuleks väljalõikamine teha väga hoolikalt ja alles pärast fikseerimist, et vältida koe kahjustamist. Koe kahjustamine võib histopatoloogilise analüüsi nurjata.
43. Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu (vt punkt 47) seisukohast kõige sobivamas fikseerimiskeskkonnas: kõik silmaga täheldatavad vigastused, aju (olulised piirkonnad, sealhulgas suuraju, väikeaju, ajusild), seljaaju, silm, magu, peensool ja jämesool (sealhulgas Peyeri naastud), maks, neerud, neerupealised, põrn, süda, harknääre, kilpnääre, hingetoru ja kopsud (kopsud pumbatakse fiksaatorit täis ja pannakse fiksaatorisse), sugunäärmed (munandid ja munasarjad), suguelundid (emakas ja emakakael, munandimanused, eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega), tupp, kusepõis, lümfisõlmed (peale manustamiskohale kõige lähedasema lümfisõlme tuleks võtta teine lümfisõlm vastavalt labori oskustele (15)), perifeerne närv (istmiku- või sääreluu närv), mis on eelistatult lihase lähedal, skeletilihase ning luu koos luuüdiga (saadud lõikamisega või alternatiivselt värskest imetud luuüdi). Munandid soovitatakse fikseerida sukeldamisega Bouini või muudetud Davidsoni fikseerimislahusesse (16, 17). *Tunica albuginea* tuleb elundi mõlemast otsast ettevaatlikult ja mitte sügavalt nõelaga läbi torgata, et fikseerimislahus saaks kiiresti sisse tungida. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Säilitada tuleks ka muud organid, mis uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt võivad tõenäoliselt olla sihtorganid.
44. Sisesekretsiooniga seotud mõjude kohta võib väärtuslikke osundusi saada järgmiste kudede uurimisega: sugunäärmed (munasarjad ja munandid), suguelundid (emakas koos emakakaelaga, munandimanused, seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega, eesnäärme dorsolateraalne ja ventraalne osa), tupp, ajuripats, isaslooma rinnanääre, harknääre ja neerupealised. Muutusi isaslooma rinnanäärmetes ei ole piisavalt dokumenteeritud, kuid see näitaja võib olla väga tundlik östrogeense toimega kemikaalide suhtes. Soovi korral võib uurida ka organeid või kudesid, mida ei ole punktis 43 loetletud (vt 2. liide).
45. Histopatoloogia juhendis (19) on üksikasjaliselt esitatud lisateavet lahkamise, fikseerimise, väljalõikamise ja sisesekretsioonikudede histopatoloogia kohta.
46. Rahvusvahelise katsetusprogrammiga saadi mõningaid tõendeid, et suguhormoonide homeostaasi vähe mõjutavate kemikaalide nõrka endokriinset toimet võib kindlaks teha pigem mitmesuguste kudede ja östruse tsükli vahelise sünkronisatsiooni häirumise kaudu, mitte aga emassuguelundite selgete histopatoloogiliste muutuste kaudu. Kuigi sellise mõju kohta selgeid tõendeid ei saadud, soovitatakse tõendeid östruse tsükli võimaliku asünkroonsuse kohta võtta arvesse munasarjade (folliikulrakkude, teekarakkude ja granulosa-rakkude), emaka, emakakaela ja tupe histopatoloogiliste muutuste tõlgendamisel. Kui tupeäietega määratakse ka tsükli faasi, võiks saadud tulemust selles võrdluses samuti arvestada.

▼ **M4****Histopatoloogia**

47. Kõikide võrdlusrühma ja suure doosiga rühmade loomade säilitatud organeid ja kudesid tuleks histopatoloogiliselt põhjalikult uurida. Histopatoloogilised uuringud tuleks teha ka muude doosirühmade loomade puhul, kui suure doosi rühmas leitakse manustamisega seotud muudatusi.
48. Uurida tuleks kõiki silmaga täheldatavaid kahjustusi.
49. Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks teha selliste kudede ja organite histopatoloogiline uuring, milles katserühma loomadel tehti kindlaks mõju.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmed**

50. Tulemused esitatakse iga üksiku looma kohta. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles iga katserühma kohta märgitakse loomade arv katse alguses, katse ajal surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arv, iga surma või surmamise aeg, mürgistusnähtudega loomade arv, täheldatud mürgistusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgistusnähtude ilmumise aeg, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik, raskusaste ja iga liiki kahjustuse kohta nende loomade protsent, kellel neid esines.
51. Võimaluse korral tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohase ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Mõju võrdlemisel manustatud doosidega tuleks vältida mitme t-testi kasutamist. Statistilised meetodid tuleks valida uuringu kavandamise etapis.
52. Kvaliteedikontrolliks soovitatakse koguda varasemaid kontrollkatsete andmeid ja arvutada arvandmete hajuvuskoeffitsiendid, eriti näitajate puhul, mis on seotud sisesekretsioonisüsteemi häirivate kemikaalide kindlaksteegemisega. Neid andmeid võib kasutada võrdlemiseks, kui hinnatakse parajasti tehtavaid uuringuid.

Katseprotokoll

53. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

- füüsikaline olemus, puhtus ja füüsikalise-keemilised omadused;
- tunnusandmed.

Kandeaine (vajaduse korral):

- kandeaine valimise põhjendus, kui kandeaine on muu kui vesi.

Katseloomad:

- kasutatud liik/liin;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;
- iga looma kehamass katse alguses;
- kui kasutatakse muud katselooma kui rott, siis liigi valimise põhjendus.

Katsetingimused:

- doositaseme valimise põhjendus;
- üksikasjad uuritava kemikaali koostise / söödavalmistise kohta, valmistises saavutatud kontsentratsiooni, stabiilsuse ja homogeensuse kohta;

▼ M4

- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- vajaduse korral söödas/joogivees oleva uuritava kemikaali määra (ppm) teisendus tegelikuks päevadoosiks (mg kehamassi kg kohta);
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad.

Uuritud valikulised näitajad:

- uuritud valikuliste näitajate loetelu.

Tulemused:

- kehamass/kehamassi muutused;
- sööda tarbimine ja vajaduse korral vee tarbimine;
- toksilise mõju andmed vastavalt looma soole ja doositasemele, sealhulgas mürgistusnähud;
- kliiniliste ilmingute laad, raskus ja kestus (sõltuvalt sellest, kas nähud on pöörduvad või mitte);
- sensoorse aktiivsuse, haardetugevuse ja motoorse tegevuse hindamine;
- hematoloogilised näitajad ja vastavad normaalväärtused;
- kliinilise biokeemia näitajad ja vastavad normaalväärtused;
- kehamass surmamise ajal ja organite mass;
- lahkamise tulemused;
- kõikide histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- võimaluse korral andmed imendumise kohta;
- vajaduse korral tulemuste statistiline töötlus.

*Tulemuste arutelu.**Järeldused.*

▼ **M4***I. liide***MÕISTED**

Androgeensus – kemikaali võime mõjutada imetaja organismi samamoodi kui looduslik meessuguhormoon (st testosteroon).

Antiandrogeensus – kemikaali võime alla suruda loodusliku meessuguhormooni (st testosterooni) mõju imetaja organismile.

Antiöstrogeensus – kemikaali võime alla suruda loodusliku östrogeense hormooni (st östradiool 17 β) mõju imetaja organismile.

Antitüroidne aktiivsus – kemikaali võime alla suruda loodusliku kilpnäärme-hormooni (st hormoon T₃) mõju imetaja organismile.

Doseerimine – üldmõiste, mis hõlmab doosi, doseerimise sagedust ja kestust.

Doos – manustatav uuritava kemikaali kogus. Doos väljendatakse uuritava kemikaali massina katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (näiteks mg / kehamassi kg / päev) või söödas oleva püsiva kontsentratsioonina.

Ilmne toksilisus – üldmõiste, mis osutab selgetele mürgistusnähtudele pärast uuritava kemikaali manustamist. Kõnealused nähud peaksid olema piisavad ohu hindamiseks ja peaksid olema sellised, et manustatava doosi suurendamise tõenäoliseks tulemuseks on tugev toksilisus ning tõenäoliselt ka surm.

NOAEL – lühend, millega tähistatakse doositaset, mis ei põhjusta ilmseid mürgistusnähte. See on kõrgeim doositase, kus doseerimine ei põhjusta manustamisega seotud leide.

Östrogeensus – kemikaali võime mõjutada imetaja organismi samamoodi kui looduslik östrogeenne hormoon (st östradiool 17 β).

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Türoidne aktiivsus – kemikaali võime mõjutada imetaja organismi samamoodi kui looduslik kilpnäärme-hormoon (st hormoon T₃).

Valideerimine – teaduslik menetlus, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi läbiviimise nõudeid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja asjakohasust konkreetse eesmärgi saavutamiseks.

▼ **M4**

2. liide

Käesolevas katsemeetodis B.7 sisesekretsioonisüsteemi häirivate kemikaalide kindlakstegemiseks soovitatavad näitajad

Kohustuslikud näitajad	Vabalt valitavad näitajad
Mass	
<ul style="list-style-type: none"> — munandid — munandimanused — neerupealised — eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega 	<ul style="list-style-type: none"> — munasarjad — emakas koos emakakaelaga — kilpnääre
Histopatoloogia	
<ul style="list-style-type: none"> — sugunäärmed: <ul style="list-style-type: none"> — munandid ja — munasarjad — suguelundid: <ul style="list-style-type: none"> — munandimanused — eesnääre ja seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmetega — emakas koos emakakaelaga — neerupealised — kilpnääre — tupp 	<ul style="list-style-type: none"> — tupeäiged — isaslooma rinnanäärmed — ajuripats
Hormoonide määramine	
	<ul style="list-style-type: none"> — T3 ja T4 tase vereringes — TSH tase vereringes

KIRJANDUS

- 1) OECD (Paris, 1992). Chairman's Report of the Meeting of the ad hoc Working Group of Experts on Systemic Short-term and (Delayed) Neurotoxicity.
- 2) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No. 60
- 3) Tupper DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. Acta Neurobiol. Exp. 40: 999–1003.
- 4) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. J. Toxicol Environ. Health 9: 691–704.
- 5) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108: 267–283.
- 6) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hindlimb Grip Strength of Rats and Mice. Neurobehav. Toxicol. 1: 233–236.

▼ M4

- 7) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599–609.
- 8) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11 March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- 9) OECD (2006). Report of the Validation of the Updated Test Guideline 407: Repeat Dose 28-day Oral Toxicity Study in Laboratory Rats. Series on Testing and Assessment No 59, ENV/JM/MONO(2006)26.
- 10) OECD (2002). Detailed Review Paper on the Appraisal of Test Methods for Sex Hormone Disrupting Chemicals. Series on Testing and Assessment No 21, ENV/JM/MONO(2002)8.
- 11) OECD (2012). Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html
- 12) OECD (2006). Final Summary report of the meeting of the Validation Management Group for mammalian testing. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)2.
- 13) OECD. Draft Summary record of the meeting of the Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment. ENV/JM/TG/EDTA/M(2006)3.
- 14) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO (2000)7.
- 15) Haley P, Perry R, Ennulat D, Frame S, Johnson C, Lapointe J-M, Nyska A, Snyder PW, Walker D, Walter G (2005). STP Position Paper: Best Practice Guideline for the Routine Pathology Evaluation of the Immune System. *Toxicol Pathol* 33: 404–407.
- 16) Hess RA, Moore BJ (1993). Histological Methods for the Evaluation of the Testis. In: *Methods in Reproductive Toxicology*, Chapin RE and Heindel JJ (eds). Academic Press: San Diego, CA, pp. 52–85.
- 17) Latendresse JR, Warbritton AR, Jonassen H, Creasy DM (2002). Fixation of testes and eyes using a modified Davidson's fluid: comparison with Bouin's fluid and conventional Davidson's fluid. *Toxicol. Pathol.* 30, 524–533.
- 18) OECD (2007). OECD Guideline for Testing of Chemicals N°440: 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. SUBAKUUTNE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL: 28-PÄEVANE UURING****KOKKUVÕTE**

Käesolev läbivaadatud katsemeetod B.8 on koostatud uuritava kemikaali sissehingamisega toimuval korduval kokkupuutel piiratud ajavahemiku jooksul (28 päeva) avalduva mürgisuse täielikuks iseloomustamiseks ning sissehingamise riski kvantitatiivse hindamise andmete saamiseks. Vähemalt viiest isas- ja viiest emasloomast koosnevad närilisterühmad viiakse 28 päeva jooksul kuus tundi päevas kokkupuutesse a) uuritava kemikaaliga kolmel või enamal kontsentratsioonil, b) filtritud õhuga (negatiivne kontrollgrupp) ja/või c) kandeainega (kandaine kontrollrühm). Loomade kokkupuude toimub üldjuhul viiel päeval nädalas, aga lubatud on ka kokkupuude seitsmel päeval nädalas. Alati katsetakse nii isas- kui ka emasloomi, aga neid võidakse viia kokkupuutesse erinevate kontsentratsioonidega, kui on teada, et üks sugu on konkreetse uuritava kemikaali suhtes tundlikum. See meetod võimaldab uuringu juhile paindlikkust kaasata satelliitrühmad (pöörduvuse rühmad), teha bronhoalveolaarset lavaaži (BAL), neuroloogiakatseid ning täiendavaid kliinilise patoloogia ja histopatoloogia alaseid hindamisi, et uuritava kemikaali mürgisust paremini iseloomustada.

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 412 (2009). Algne sissehingamisel avalduvat subakuutset mürgisust käsitlev katsejuhend (katsejuhend nr 412) võeti vastu 1981. aastal (1). Käesolev katsemeetod B.8 (mis on samaväärne katsejuhendi nr 412 läbivaadatud versiooniga) on ajakohastatud, et võtta arvesse teaduse taset ja rahuldada praegusi ja tulevase regulatiivseid vajadusi.
2. Käesolev meetod võimaldab iseloomustada uuritava kemikaali sissehingamisega toimuval korduval igapäevasel kokkupuutel 28 päeva jooksul avaldatavat kahjulikku mõju. Sissehingamisel avalduva subakuutse mürgisuse 28-päevastest uuringutest saadud andmeid on võimalik kasutada kvantitatiivseteks riskihindamiseks (kui neile ei järgne sissehingamisel avalduva subkroonilise mürgisuse 90-päevane uuring (käesoleva lisa peatükk B.29)). Andmetest saab samuti teavet pikema ajavahemiku uuringu jaoks (näiteks sissehingamise subkroonilise mürgisuse 90-päevase uuringu jaoks) kontsentratsioonide valimiseks. Käesolev katsemeetod ei ole spetsiaalselt ette nähtud nanomaterjalide katsetamiseks. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud selle peatüki lõpus ja juhenddokumendis nr 39 (2).

LÄHTEKAALUTLUSED

3. Enne käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemist peaks uurimislabor läbi vaatama kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, et parandada uuringu kvaliteeti ja minimeerida loomade kasutamist. Teave, mis aitab valida katseks sobivad uuritavad kontsentratsioonid, hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalise-keemilised omadused; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed ja toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuriga ainete kohta ning sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse katsete andmed. Kui uuringu puhul eeldatakse neurotoksilisust või täheldatakse uuringus selle olemasolu, võib uuringu juht otsustada teha sellekohased hindamised, näiteks funktsionaalsed vaatluskatsed (*functional observational battery*, FOB) ja motoorse aktiivsuse mõõtmise. Kuigi konkreetsete hindamiste jaoks kokkupuute korraldamise ajastus võib olla kriitilise tähtsusega, ei tohiks kõnealused täiendavad uuringud põhiuuringu kava elluviimist segada.

▼ **M4**

4. Söövitava või ärritava uuritava kemikaali lahjendatud lahuseid võib katsetada kontsentratsioonil, mis annab soovitud mürgisuse määra (vt juhenddokument nr 39 (2)). Loomade kokkupuutesse viimisel kõnealuste materjalidega peaks sihtkontsentratsioon olema piisavalt väike, et see ei põhjustaks märkimisväärselt valu ega kannatusi, kuid piisav, et pikendada kontsentratsiooni-mõju kõver tasemeni, millega saavutatakse katse regulaatiivne ja teaduslik eesmärk. Kõnealused kontsentratsioonid tuleks valida juhtumipõhiselt, eelistatavalt asjakohaselt koostatud doosipiirkonna määramise katse alusel, millega saadakse teavet kõige olulisema näitaja, ärrituse ilmumise läviväärtuse ja aja kohta (vt punktid 11–13). Tuleks esitada kontsentratsiooni valimise põhjendus.
5. Suremas olevad loomad ja loomad, kes ilmselgelt kannatavad valu või kellel ilmnevad tõsiste või kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaansel viisil surmata. Suremas olevaid loomi võetakse katsetulemuste tõlgendamisel arvesse samamoodi kui katse käigus surnud loomi. Kriteeriumid, mille põhjal tehakse suremas oleva või raskelt kannatava looma surmamise otsus, ja juhised prognoositava või läheneva surma kindlakstegemiseks on esitatud humaanseid lõpetamiskriteeriume käsitlevas OECD juhenddokumendis (3).

MEETODI KIRJELDUS**Loomaliigi valimine**

6. Kasutatakse enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi. Eelistatud liigiks on rott. Muu liigi kasutamise korral tuleks seda põhjendada.

Loomade ettevalmistamine

7. Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Randomiseerimise päeval peaksid loomad olema seitsme kuni üheksa nädala vanused noored täiskasvanud. Kehamass ei tohiks erineda rohkem kui $\pm 20\%$ samast soost loomade keskmisest kehamassist. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks ning hoitakse oma puuris vähemalt viis päeva enne katse algust, et võimaldada neil laboritingimustega kohaneda.

Pidamistingimused

8. Loomad peaksid olema individuaalselt märgistatud, võimaluse korral nahaluse transponderiga, et hõlbustada vaatlust ja vältida segiajamist. Katseloomade pidamise ruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuigi see ei pruugi olla võimalik, kui kandainena kasutatakse vett. Enne ja pärast kokkupuudet tuleks loomad tavaliselt paigutada soo ja kontsentratsiooni alusel rühmitatuna puuridesse, kuid loomade arv puuris ei tohiks segada iga looma täpset jälgimist ning peaks minimeerima loomade suremist kannibalismi ja võitlemise tõttu. Kui loomade kokkupuude toimub ainult nina kaudu, siis võib olla vajalik lasta neil hoiutorudega kohaneda. Hoiutorud ei tohiks põhjustada loomadele üleareid füüsilisi, soojusest või piiratud liikumisvõimest tingitud ebamugavusi. Loomade liikumise piiramine võib mõjutada füsioloogilisi näitajaid, näiteks kehatemperatuuri (hüpertermia) ja/või hingamise minutimahtu. Kui on kättesaadavad üldandmed, mille kohaselt kõnealused muutusi märkimisväärses ulatuses ei teki, ei ole eelnev hoiutoruga kohaneamine vajalik. Kogu keha kaudu aerosooliga kokku puutuvaid loomi tuleks kokkupuute ajal eraldi hoida, et vältida loomadepoolset uuritava aerosooli filtrimist läbi oma puurikaaslaste karvkatte. Võib kasutada tavalisi ja sertifitseeritud laborisöötasid, v.a kokkupuute ajal, ning anda piiramatus koguses kraanivett. Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.

▼ **M4****Inhalatsioonikambriid**

9. Inhalatsioonikambri valimisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali laadi ja katse eesmärgi. Eelistatav kokkupuuteviis on ainult nina kaudu (mis hõlmab ainult pea, nina või koonu kaudu kokkupuudet). Ainult nina kaudu toimuvad kokkupuudet eelistatakse üldiselt vedelik- või pulberaerosooli ja aerosooliks kondenseeruda võiva auruga tehtavate uuringute puhul. Uuringu erieesmärgi saavutamiseks võib parem olla kokkupuude kogu keha kaudu, kuid seda tuleks katseprotokollis põhjendada. Kogukehakambri kasutamise korral keskkonna stabiilsuse tagamiseks ei tohiks katseloomade kogumaht kambri ületada 5 % kambri mahust. Ainult nina ja kogu keha kaudu kokkupuute tehnilisi põhimõtteid ning konkreetseid eeliseid ja puudujääke on kirjeldatud juhenddokumendis nr 39 (2).

TOKSILISUSE UURINGUD**Piirkontsentratsioonid**

10. Erinevalt ägeda mürgisuse uuringutest ei ole sissehingamisel avalduva subakuutse mürgisuse 28-päevastel uuringutel kindlaksmääratud piirkontsentratsioonid. Maksimaalse katsetatava kontsentratsiooni valimisel tuleks arvesse võtta järgmist: 1) maksimaalne saavutatav kontsentratsioon, 2) millise kemikaalikeskonnaga võib inimene kokku puutuda halvimal juhul, 3) vajadus säilitada piisav varustus hapnikuga ja/või 4) loomade heaolu kaalutlused. Kui andmetel põhinevad piirangud puuduvad, võib kasutada määruse (EÜ) nr 1272/2008 (13) ägeda mürgisuse piirmäärasid (st kuni kontsentratsioonini 5 mg/l aerosooli puhul, 20 mg/l auru puhul ja 20 000 ppm gaasi puhul); vt juhenddokument nr 39 (2). Kui kõnealune piirmäär tuleb gaasi või väga lenduva uuritava kemikaali (näiteks külmutusagens) katsetamisel ületada, tuleks seda põhjendada. Piirkontsentratsioonil peaks ilmema üheselt mõistetav mürgisus, kuid see ei tohiks põhjustada loomadele liigset stressi ega lühendada nende elu (3).

Doosipiirkonna määramise katse

11. Enne põhiuuringu alustamist võib olla vaja teha doosipiirkonna määramise katse. Doosipiirkonna määramise katse on eeluuringust põhjalikum, kuna selles ei piirduta kontsentratsiooni valimisega. Doosipiirkonna määramise katsest saadud teadmistest võib sõltuda põhiuuringu edukus. Doosipiirkonna määramise katse võidakse näiteks saada tehnilist teavet analüüsimeetodite ja osakeste suuruse määramise kohta, teha kindlaks toksilisuse mehhanisme, saada kliinilise patoloogia ja histopatoloogia andmeid ning hinnata, milline võib põhiuuringus olla täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) ja minimaalne mürgine kontsentratsioon (MTC). Uuringu juht võib otsustada kasutada doosipiirkonna määramise katset, et määrata kindlaks hingamisteede ärrituse läviväärtus (näiteks hingamisteede histopatoloogia, kopsutalitluse katsete või bronhoalveolaarse lavaaži abil), maksimaalne kontsentratsioon, mille juures loomadele ei tekitata liigset stressi, ja uuritava kemikaali mürgisust kõige paremini iseloomustavad parameetrid.
12. Doosipiirkonna määramise katse võib hõlmata ühte või enam kontsentratsiooni. Iga kontsentratsiooniga peaks kokku puutuma kuni kolm isas- ja kolm emaslõoma. Doosipiirkonna määramise katse peaks kestma vähemalt viis päeva ja üldjuhul mitte kauem kui 14 päeva. Põhiuuringu kontsentratsioonide valimise põhjendused tuleks esitada uuringuprotokollis. Põhiuuringu eesmärk on näidata mõju sõltuvust kontsentratsioonist eelduste kohaselt kõige tundlikuma näitaja alusel. Väike kontsentratsioon peaks ideaaljuhul olema täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon ja suur kontsentratsioon peaks näitama üheselt mõistetavat mürgistust, kuid see ei tohiks põhjustada loomadele liigset stressi ega lühendada nende elu (3).

▼M4

13. Doosipiirkonna määramise katse jaoks kontsentratsioonide valimisel tuleks arvesse võtta kogu saadaolevat teavet, sh struktuuri-aktiivsuse sõltuvusi ja samalaadseid kemikaale käsitlevaid andmeid (vt punkt 3). Doosipiirkonna määramise katse võib kinnitada mehhanistlike kriteeriumide alusel kõige tundlikumaks peetavaid näitajaid, nagu organofosfaatide põhjustatud kolliinesteraasi inhibeerimine, erütrotsütotoksiliste ainete põhjustatud methemoglobiini teke, türoidhormoonid (T_3 , T_4) türotoksikantide puhul, valk, laktaatdehüdrogenaas (LDH) või neutrofiilid bronhoalveolaarses lavaažis ohutute vähe lahustuvate osakeste või kopse ärritavate aerosoolide puhul, või need ümber lükata.

Põhiuuring

14. Subakuutse mürgisuse põhiuuring hõlmab üldjuhul kolme kontsentratsiooni ning vajaduse korral samuti samaaegseid negatiivseid (õhu) ja/või kandeaine kontrollrühmi (vt punkt 17). Asjakohaste kokkupuutetasemetel valimisel tuleks kasutada kõiki kättesaadavaid andmeid, sh süsteemse mürgisuse uuringute, metaboliseerimise ja kineetika uuringute tulemusi (eriti tuleks tähelepanu pöörata suure kontsentratsiooni vältimisele, mille puhul kineetilised protsessid küllastatakse). Iga katserühm koosneb vähemalt kümnest närilisest (viis isas- ja viis emaslooma), kes viiakse uuritava kemikaaliga kokkupuutesse kuueks tunniks päevas viiel päeval nädalas nelja nädala vältel (uuringu kogukestus on 28 päeva). Loomad võib viia kokkupuutesse ka seitsmel päeval nädalas (näiteks sissehingatavate ravimite katsetamisel). Kui üks sugu on teatava uuritava kemikaali suhtes teadaolevalt tundlikum, võib eri sugude puhul kasutada kokkupuutel erinevaid kontsentratsioone, et optimeerida mõju kontsentratsioonist sõltuvust, nagu on kirjeldatud punktis 15. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu näriliseliigi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Päevas vähem kui kuuetunnise kokkupuute kasutamisel või kui on vajalik korraldada pika kestusega (näiteks 22 tundi päevas) kogu keha kaudu kokkupuute uuring, tuleb seda põhjendada (vt juhenddokument nr 39 (2)). Loomi ei tohiks kokkupuute ajal sööta, v.a juhul, kui kokkupuuteperiood ületab kuut tundi. Kogu keha kaudu toimuva kokkupuute ajal võib loomadele anda vett.
15. Valitud sihtkontsentratsioonid peaksid võimaldama kindlaks teha sihtorgani(d) ja saada mõju selge sõltuvus kontsentratsioonist.

- Suur kontsentratsioon peaks põhjustama mürgist mõju, kuid ei tohiks põhjustada püsivaid nähte ega surma, mis takistaks usaldusväärset hindamist.
- Keskmine (keskmised) kontsentratsioon(id) peaks(id) olema eraldatud, et esile kutsuda eri tugevusega mürgist mõju väikese ja suure kontsentratsiooni vahemikus.
- Väike kontsentratsioon peaks põhjustama vähe mürgistusnähtusid või olema mõjuta.

Satelliituuring (pöörduvuse uuring)

16. Mürgistuse pöörduvuse, püsivuse või viivitusega avaldumise jälgimiseks võidakse korraldada satelliituuring (pöörduvuse uuring) töötlusjärgsel asjakohase pikkusega ajavahemikul, mis ei tohi olla lühem kui 14 päeva. Satelliitühmades (pöörduvuse rühmades) on viis isas- ja viis emaslooma, kellele korraldatakse kokkupuude põhiuuringu katseloomadega samal ajal. Satelliituuringu (pöörduvuse uuringu) rühmad peaksid uuritava kemikaaliga kokku puutama suurimal kontsentratsioonil ning vajaduse korral tuleks kasutada samaaegseid õhu ja/või kandeaine kontrollrühmi (vt punkt 17).

▼ **M4****Loomade kontrollrühm**

17. Samaaegse negatiivse (õhu) kontrollrühma loomi tuleks kohelda katserühma loomadega samalaadsel viisil selle erinevusega, et nad viiakse uuritava kemikaali asemel kokkupuutesse filtritud õhuga. Kui katsekeskkonna loomisel kasutatakse vett või muud ainet, tuleks uuringus kasutada negatiivse (õhu) kontrollrühma asemel kandeaine kontrollrühma. Võimaluse korral tuleks kandeainena alati kasutada vett. Kui kandeainena kasutatakse vett, peaks loomade kontrollrühm puutama kokku sama suhtelise õhuniiskusega õhuga kui katse käigus kokku puutuvad rühmad. Sobiva kandeaine valimine peaks põhinema asjakohasel eeluuringul või varasematel andmetel. Kui kandeaine mürgisus ei ole hästi teada, võib uuringu juht otsustada kasutada nii negatiivset (õhu) kontrollrühma kui ka kandeaine kontrollrühma, kuid see ei ole soovitatav. Kui varasematest andmetest nähtub, et kandeaine ei ole mürgine, ei ole negatiivset (õhu) kontrollrühma vaja ja tuleks kasutada ainult kandeaine kontrollrühma. Kui kandeaines oleva uuritava kemikaali eeluuringust mürgisust ei nähtu, siis võib järeldada, et kandeaine ei ole katsetataval kontsentratsioonil mürgine ja tuleks kasutada selle kandeaine kontrollrühma.

KOKKUPUUTETINGIMUSED**Kontsentratsioonide manustamine**

18. Loomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on gaas, aur, aerosool või nende segu. Katses kasutatav füüsikaline olek sõltub uuritava kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest, valitud kontsentratsioonist ja/või uuritava kemikaali kõige tõenäolisemast füüsilisest vormist käsitsemise ja kasutamise ajal. Hügrokoopseid ja väga reaktsioonivõimelisi uuritavaid kemikaale tuleks katsetada kuiva õhu tingimustes. Tuleks olla ettevaatlik, et vältida plahvatusohtliku kontsentratsiooni tekkimist. Aineosakesi võib osakeste suuruse vähendamiseks mehaaniliselt töödelda. Täpsemad juhendid on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

Osakeste suurusjaotus

19. Osakeste suurusjaotus tuleks määrata kõigi aerosoolide puhul ja samuti aurude puhul, mis võivad kondenseeruda ja moodustada aerosooli. Hingamisteede kõigi asjakohaste piirkondadega kokkupuute võimaldamiseks soovitatakse kasutada aerosooli, mille osakeste massikeskmise aerodünaamiline diameeter (MMAD) on vahemikus 1–3 µm ning geomeetriline standardhälve (σ_g) on 1,5–3,0 (4). Kõnealuse standardi järgimiseks tuleks teha mõistlikud jõupingutused; kui standardit ei ole võimalik järgida, tuleks esitada eksperdi hinnang. Näiteks metallisuitsu osakesed võivad olla kõnealusest normväärtusest väiksemad ning laenguga osakesed ja kiud võivad sätestatud näitajaid ületada.

Uuritava kemikaali preparaati kandeaines

20. Ideaaljuhul tuleks uuritavat kemikaali katsetada ilma kandeaineta. Kui kandeaine kasutamine on vajalik sobiva uuritava kemikaali kontsentratsiooni ja osakeste suuruse tekitamiseks, tuleks eelistatavalt kasutada vett. Alati, kui uuritav kemikaal lahustatakse kandeaines, tuleks tõendada uuritava kemikaali stabiilsust.

KOKKUPUUTETINGIMUSTE SEIRE**Kambri õhuvarustus**

21. Kokkupuutekambri õhuvarustust tuleks hoolikalt kontrollida, pidevalt seirata ning andmed iga kokkupuute korral vähemalt kord tunnis registreerida. Katsekeskkonna kontsentratsiooni (või ajalise stabiilsuse) reaajas seire on kõigi dünaamiliste parameetrite mõõtmisel tingimata vajalik ja kujutab endast kaudset vahendit sissehingamise kõigi asjakohaste dünaamiliste parameetrite kontrollimiseks. Kui kontsentratsiooni jälgitakse reaajas, võib

▼ **M4**

õhuvoogude mõõtmise sageduse vähendada ühele mõõtmisele kokkupuute kohta päevas. Ainult nina kaudu kokkupuudet võimaldava kambri puhul tuleks eritähelpanu pöörata väljahingatud õhu uuesti sissehingamise vältimisele. Hapnikusisaldus peaks olema vähemalt 19 % ja süsinikdioksiidisisaldus ei tohiks ületada 1 %. Kui on alust arvata, et kõnealuseid norme ei ole võimalik täita, tuleks hapniku- ja süsinikdioksiidisisaldust mõõta. Kui kokkupuute esimese päeva mõõtmistest nähtub, et kõnealuste gaaside sisaldus on nõuetekohasel tasemel, ei peaks edasine mõõtmine olema vajalik.

Kambri temperatuur ja suhteline õhuniiskus

22. Kambri temperatuur tuleks hoida 22 ± 3 °C juures. Loomade hingamistsooni suhtelist õhuniiskust nii ainult nina kui ka kogu keha kaudu toimuva kokkupuute korral tuleks pidevalt seirata ja see tuleks registreerida võimaluse korral üks kord tunnis iga kokkupuute ajal. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatavalt hoida vahemikus 30–70 %, kuid uuritava kemikaali mõju tõttu ei pruugi see olla saavutatav (näiteks veepõhise segu uurimisel) või mõõdetav.

Uuritav kemikaal: nimikontsentratsioon

23. Kui see on võimalik, tuleks kokkupuutekambri nimikontsentratsioon alati arvutada ja registreerida. Nimikontsentratsioon on katsekeskkonda lisatud uuritava kemikaali mass, mis on jagatud läbi kambriüsteemi suunatud õhu kogumahuga. Nimikontsentratsiooni ei kasutata loomade kokkupuute iseloomustamiseks, kuid nimikontsentratsiooni võrdlus tegeliku kontsentratsiooniga näitab katseüsteemi kemikaali lisamise tõhusust ning seega saab seda kasutada kemikaali lisamisel esinevate probleemide avastamiseks.

Uuritav kemikaal: tegelik kontsentratsioon

24. Tegelik kontsentratsioon on inhalatsioonikambri loomade hingamistsoonist võetud proovist määratud uuritava kemikaali kontsentratsioon. Tegelikke kontsentratsioone on võimalik saada kas spetsiifiliste meetodite abil (näiteks otsene proovivõtt, adsorptsiooni või keemilise reaktsiooni meetodid ning järgnev analüüsimine) või mittespetsiifiliste meetodite abil, näiteks filtrite gravimeetiline analüüs. Gravimeetrilise analüüsi kasutamine on lubatud ainult ühest koostisainest koosneva pulberaerosooli või vähelenduva vedeliku aerosooli korral ja see peaks olema enne katse tegemist kinnitatud konkreetse kemikaali määramisega. Mitmest koostisainest koosneva pulberaerosooli kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks võib samuti kasutada gravimeetrilist analüüsi. Sel juhul tuleb analüüsiga tõendada, et õhus oleva materjali koostis sarnaneb lähtematerjali koostisega. Kui selline teave ei ole kättesaadav, võib osutada vajalikuks teha uuringu vältel uuritava kemikaali (eelistatult lenduvas olekus) kordusanalüüse korrapäraste ajavahemike järel. Aerosoolainete puhul, mis võivad aurustuda või sublimeeruda, tuleks näidata, et valitud meetodiga koguti kõiki faase.
25. Võimaluse korral tuleks kogu katse jooksul kasutada uuritava kemikaali ühte partiid ning uuritavat proovi tuleks säilitada tingimustes, milles säilib selle puhtus, homogeensus ja stabiilsus. Enne uuringu alustamist tuleks uuritavat kemikaali, sh selle puhtust, iseloomustada; kui see on tehniliselt võimalik, tuleb keemiliselt määratleda ka kindlakstehtud saasteained ja lisandid ning määrata nende kogused. Seda on võimalik tõendada muu hulgas järgmiste andmete alusel: retentsiooniaeg ja suhteline piigipindala, molekulmass massispektroskoopia või gaaskromatograafia analüüsist või muud hinnangud. Kuigi uurimislabor ei vastuta uuritava kemikaali proovi keemilise määramise eest, võib uurimislaboril olla mõttekas kinnitada tellija iseloomustust vähemalt piiratud ulatuses (näiteks värv, füüsikalised omadused jne).

▼M4

26. Kokkupuutekeskkonda hoitakse võimaluste piires muutumatuna. Kokkupuuteitingumuste stabiilsuse tõendamiseks võib kasutada reaajas seire seadet, näiteks aerosooli fotomeetrit aerosoolide puhul või süsivesinike kogusisalduse analüsaatorit aurude puhul. Tegelikku kambrikontsentratsiooni tuleks mõõta vähemalt kolm korda iga kokkupuutepäeva jooksul iga kokkupuutekontsentratsiooni kohta. Kui see piiratud õhuharustuse või väikeste kontsentratsioonide tõttu ei ole võimalik, võib kogu kokkupuuteperioodi kohta võtta ühe proovi. Ideaaljuhul tuleks kõnealune proov võtta kogu kokkupuuteaja jooksul. Kambrist võetud proovide kontsentratsioon ei tohiks keskmisest kontsentratsioonist erineda rohkem kui $\pm 10\%$ gaaside ja aurude puhul või $\pm 20\%$ vedelik- või pulberaerosoolide korral. Tuleks arvutada kambri tasakaaluoleku saavutamise aeg (t_{95}) ja see registreerida. Kokkupuute ajavahemik kestab selle aja, kui uuritavat kemikaali lisatakse. Selles võetakse arvesse aega, mis on vajalik kambri tasakaaluseisundi saavutamiseks (t_{95}) ja kontsentratsiooni vähenemiseks. Juhendid t_{95} hindamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).
27. Väga keeruka segu puhul, mis koosneb gaasidest/aurudest ja aerosoolidest (näiteks põlemiskeskonnad ja uuritavad kemikaalid, mida paiskab välja mõni eriotstarbeline lõppkasutustoode või -seade), võib iga faas käituda inhalatsioonikambris erinevalt. Seepärast tuleks valida vähemalt üks uuritav aine (mida analüüsiga määratakse), tavaliselt sellise segu peamine toimeaine, iga faasi (gaas/aur ja aerosool) kohta. Kui uuritav kemikaal on segu, tuleks kirja panna kogu segu analüütiline kontsentratsioon ja mitte ainult toimeaine või komponendi (analüüsiga määratava aine) kontsentratsioon. Lisateave tegelike kontsentratsioonide kohta on juhenddokumendis nr 39 (2).

Uuritav kemikaal: osakeste suurusjaotus

28. Aerosooliosakeste suurusjaotus tuleks kindlaks määrata vähemalt iga nädal iga kontsentratsiooni kohta, kasutades kaskaadimpaktorit või alternatiivset seadet, näiteks aerodünaamilist osakeste suuruse määrajat. Kui on võimalik tõendada kaskaadimpaktori ja alternatiivse seadme abil saadud tulemuste võrdväärsust, võib kogu uuringu tegemiseks kasutada alternatiivset seadet.
29. Paralleelselt peamise seadmega tuleks kasutada muud seadet, näiteks gravimeetrilist filtrit või minitsüklonit või gaasipesukolbi, et veenduda peamise seadme kogumistõhususes. Osakeste suuruse analüüsi kaudu saadud massikontsentratsioon peaks mõistlikes piirides kokku langema filtrianalüüsi abil saadud massikontsentratsiooniga (vt juhenddokument nr 39 (2)). Kui uuringu varajases etapis on kõikidel uuritavatel kontsentratsioonidel võimalik tõendada võrdväärsust, võib täiendavatest kinnitavatest mõõtmistest loobuda. Loomade heaolu silmas pidades tuleks võtta meetmeid, et mitte saada katsest ebaselgeid andmeid, mille tõttu võib olla vajalik uuringut korrata.
30. Aurudega tuleks teha osakeste suurusjaotuse määramine sel juhul, kui on võimalik, et auru kondensatsiooni tõttu võib tekkida aerosool või kui auru keskkonnas tuvastatakse osakesi, mille puhul võib tegemist olla faaside seguga.

VAATLUSED

31. Loomi tuleks enne kokkupuuteperioodi, selle vältel ja pärast seda kliiniliselt jälgida. Olenevalt loomade reageerimisest kokkupuutele võidakse ette näha sagedasem jälgimine. Kui loomade jälgimist takistab looma hoiutoru, halvasti valgustatud kogukehakamber või läbipaistmatu keskkond, tuleks loomi hoolikalt jälgida pärast kokkupuudet. Enne järgmise päeva kokkupuudet toimuva jälgimise abil on võimalik hinnata mürgise mõju pöörduvust või süvenemist.

▼ **M4**

32. Kõik vaatlusandmed registreeritakse iga looma kohta eraldi. Kui loomad surmatakse humaansetel kaalutlustel või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.
33. Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade, limaskestade, hingamis-, vereringe- ja närvisüsteemi muutusi, samuti somatomotoorse aktiivsuse ja käitumismustri muutusi. Tähelepanu peaks olema suunatud väärinade, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma kindlakstegemisele. Pärakutemperatuuri mõõtmine võib anda lisaandmeid refleksipõhise hingamise aeglustumise või hüpo-/hüpertermia kohta, mis on seotud kokkupuute või vangistusega. Uuringusse võib lisada täiendavaid hindamisi, nagu kineetika, bioseire, kopsutalitlus, kopsukudedesse kogunevate vähe lahustuvate materjalide püsivus ja käitumismuutused.

KEHAMASS

34. Iga looma kehamass tuleks registreerida natuke enne esimest kokkupuudet (päev 0) ja seejärel kaks korda nädalas (näiteks reedeti ja esmaspäeviti, et tõendada taastumist ilma kokkupuuteta nädalavahetuse jooksul, või pärast ajavahemikku, mis võimaldab süsteemse mürgisuse hindamist) ning surma või eutanaasia ajal. Kui esimese kahe nädala jooksul nähtusid ei ilmne, võib ülejäänud uuringu vältel mõõta kehamassi kord nädalas. Satelliitrühma (pöördivuse rühma) loomade (kui neid kasutatakse) kaalumist tuleks jätkata iga nädal kogu taastumisperioodi vältel. Uuringu lõpetamisel tuleks iga looma veidi enne surmamist kaaluda, et võimaldada organite ja kehamassi suhte täpset arutamist.

SÕÖDA JA VEE TARBIMINE

35. Sööda tarbimist tuleks mõõta iga nädal. Samuti võib mõõta vee tarbimist.

KLIINILINE PATOLOOGIA

36. Kliinilise patoloogia hindamised tuleks teha igale loomale, sh kontrollrühma ja satelliitrühma (pöördivuse rühma) loomadele, kui nad surmatakse. Kokkupuute lõpetamise ja vereproovide võtmise vaheline ajavahemik tuleks registreerida, eriti kui kõnealuse näitaja taastumine on kiire. Plasmast kiiresti kaduvate indikaatorainete (näiteks COHb, CHE ja MetHb) määramiseks tuleb proov võtta kohe pärast kokkupuute lõppu.
37. Tabelis 1 on loetletud kliinilised patoloogilised parameetrid, mida nõutakse üldjuhul kõigi toksikoloogiliste uuringute puhul. Uriinianalüüs ei ole alati vajalik; selle võib teha, kui seda oodatava või ilmnunud toksilisuse tõttu peetakse kasulikuks. Uuringu juht võib uuritava kemikaali mürgisuse paremaks iseloomustamiseks otsustada hinnata täiendavaid parameetreid (näiteks koliinesteraas, lipiidid, hormoonid, happe-aluse tasakaal, methemoglobiin või Heinzi kehakesed, kreatiinkinaas, müeloidi/erütroidi suhe, troponiinid, arteriaalse vere gaasid, laktaatdehüdrogenaas, sorbitooldehüdrogenaas, glutamaatdehüdrogenaas ja γ -glutamüül-transpeptidaas).

▼ **M4**

Tabel 1

Standardised kliinilise patoloogia parameetrid

Hematoloogia	
Erütrotsüütide arv	Leukotsüütide koguarv
Hematokrit	Diferentseeritud leukotsüütide arv
Hemoglobiini kontsentratsioon	Trombotsüütide arv
Hemoglobiini keskmine kogus erütrotsüüdis (MCH)	Hüübimisvõime (valige üks):
Keskmine erütrotsüüdi maht (MCV)	— protrombiini aeg
Hemoglobiini keskmine kontsentratsioon erütrotsüüdis	— hüübimisaeg
Retikulotsüüdid	— osalise tromboplastiini aeg
Kliiniline keemia	
Glükoos (*)	Alaniinaminotransferaas
Üldkolesterool	Aspartaataminotransferas
Triglütseriidid	Leeliseline fosfataas
Vere karbamiidlämmastik	Kaalium
Üldbilirubiin	Naatrium
Kreatiniin	Kaltsium
Üldvalk	Fosfor
Albumiin	Kloriid
Globuliin	
Uriinianalüüs (valikuline)	
Välimus (värvus ja hägusus)	Üldvalk
Kogus	Glükoos
Suhteline tihedus või osmolaalsus	Veri/vererakud
pH	

(*) Kuna pikaajaline nälgimine võib põhjustada glükoosi mõõtmise tulemuste erinevust katsesüsteemi ja kontrollrühma loomade vahel, peaks uuringu juht otsustama, kas loomade söödata jätmise on asjakohane. Kui loomad jäetakse söödata, peaks ajavahemik olema vastav kasutatavale liigile; roti puhul võib see ajavahemik olla 16 tundi (nälgimine öö jooksul). Paastuglükoosi võib määrata pärast öist nälgimist viimasel kokkupuutenädalal või pärast öist nälgimist enne lahkamist (viimasel juhul määratakse paastuglükoos koos kõigi muude kliinilise patoloogia näitajatega).

38. Kui on tõendeid, et peamine kogunemise ja säilitamise piirkond on madalamad hingamisteed (s.o alveoolid), võib oletatava doosi-toime seose parameetrite kvantitatiivseks hindamiseks kasutada bronho-alveolaarset lavaaži, keskendudes alveoliidile, kopsukoe põletikule ja fosfolipidoosile. See võimaldab asjakohaselt kontrollida alveolaarse kahjustuse puhul esinevat doosi-toime seost ning toime sõltuvust ajast. Bronhoalveolaarse lavaaži vedelikku võib analüüsida leukotsüütide üldarvu ja diferentseeritud leukotsüüdiarvude, üldvalgu ja laktaatdehüdrogenaasi määramiseks. Veel võib kaaluda lüsoosomide kahjustust, fosfolipidoosi, fibroosi ning ärritus- või allergilist põletikku tõendavate näitajate määramist, selleks võib määrata ka põletikuaineid tsütokiine/kemokiine. Bronhoalveolaarse lavaaži mõõtmised üldiselt täiendavad histopatoloogiliste uuringute tulemusi, kuid ei saa neid asendada. Kopsude lavaaži tegemise juhendid on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

▼ **M4****MAKROPATOLOGIA JA ORGANITE MASS**

39. Kõik katseloomad (kaasa arvatud katse käigus surnud, humaansel viisil surmatud või uuringust looma heaolu tagamiseks kõrvaldatud loomad) tuleks (võimaluse korral) täielikult veretustada ja täielikult lahata. Iga looma viimase kokkupuute lõpu ja surmamise vaheline ajavahemik tuleks registreerida. Kui lahkamine vahetult pärast surnud looma leidmist ei ole võimalik, tuleks loom jahutada (mitte külmutada) autolüüsi minimeerimiseks piisavalt madala temperatuurini. Lahata tuleks võimalikult kiiresti, tavaliselt ühe või kahe päeva jooksul. Iga looma kõik üldpatoloogilised muutused tuleks registreerida, pöörates eritähelepanu hingamisteede mis tahes muutustele.
40. Tabelis 2 on loetletud organid ja koed, mis täieliku lahkamise ajal tuleks sobivas keskkonnas säilitada histopatoloogilise uuringu jaoks. [Nurksulgedes esitatud] organite ja kudede ning muude organite ja kudede säilitamise otsustab uuringu juht. **Paksus kirjas esitatud** organid tuleb välja puhastada ja kaaluda nii kiiresti kui võimalik, et vältida kuivamist. Kilpnääret ja munandimanuseid tuleks kaaluda ainult vajaduse korral, kuna nende väljapuhastamisel tekkivad moonutused võivad takistada histopatoloogilist hindamist. Koed ja organid tuleks paigutada 10 % puhverdatud formaliini või muusse sobivasse fikseerivasse ainesse vahetult pärast lahkamist ja mitte vähem kui 24–48 tundi enne väljapuhastamist, olenevalt kasutatavast fikseerivast ainest.

Tabel 2

Täieliku lahkamise juures säilitatavad organid ja koed

Neerupealsed	Seemnepõiekesed
Luuüdi (ja/või värske aspiraati)	Seljaaju (kaela-, rinna- ja nimmepiirkond)
Aju (sh suuraju osad, väikeaju ning piklikaju/ajusild)	Põrn
[Silmad (võrkkest, nägemisnärv) ja silmalaud]	Magu
Süda	Munandid
Neerud	Harknääre
Kõri (3 taset, üks tase hõlmab kõripealise põhja)	Kilpnääre
Maks	Hingetoru (vähemalt 2 tasandit, sh 1 pikisuunaline lõige läbi hingetoruharja ja 1 ristlõige)
Kopsud (kõik ühe tasandi sagarad, sh peamised bronhid)	[Kusepõis]
Lümfisõlmed kopsu kopsuvärgi piirkonnast eelkõige vähe lahustuvatest osakestest koosneva uuritava kemikaali korral. Põhjalikuma immunoloogiavaatluse või -uuringu jaoks võib kaaluda täiendavate lümfisõlmede, näiteks keskseinandi, kaela/submandibulaarse ja/või kõrva piirkonna lümfisõlmede säilitamist.	Emakas
Nasofarüingealsed koed (vähemalt neljal tasandil; üks tasand peab hõlmama nasofarüingealset kanalit ja ninaga seotud lümfikude (NALT)).	Kõik silmaga nähtavad kahjustused
Söögitoru	
[Haistmissibul]	
Munasarjad	

▼ **M4**

41. Kopsud tuleks tervena eemaldada, kaaluda ja paigutada sobivasse fikseerivasse ainesse rõhul 20–30 cm veesammast, et tagada kopsude struktuuri säilimine (5). Tuleks koguda ühel tasandil tehtud lõiked kõikidest sagaratest, sh peamistest bronhidest, kuid kui tehakse kopsude lavaaž, tuleks sellest sagarast, millele lavaaži ei tehtud, teha lõiked kolmel tasandil (mitte seeria- viisilised lõiked).
42. Tuleks uurida vähemalt nelja nasofarüingeaalsete kudede tasandit, millest üks peaks hõlmama nasofarüingeaalset kanalit (5, 6, 7, 8, 9), et võimaldada asjakohaselt uurida skvamooarakulist, ülemineku- (hingamisteede *clara*-rakud), hingamisteede (ripsepiteel) ja olfaktorset epiteeli ning neid dreenivat lümfikude (NALT; 10, 11). Tuleks uurida kõri kolme tasandit ja üks neist tasanditest peaks hõlmama kõripealise põhja (12). Tuleks uurida vähemalt kahte hingetoru tasandit, sh ühte pikisuunalist lõiget läbi peabronhide bifurkatsiooni harja ja ühte ristlõiget.

HISTOPATOLOOGIA

43. Kontrollrühma ja suure kontsentratsiooni rühma ning kõigi loomade puhul, kes uuringu jooksul surevad või surmatakse, tuleks teha kõigi tabelis 2 loetletud organite ja kudede histopatoloogiline hindamine. Eritähelepanu tuleks pöörata hingamisteedele, sihtorganitele ja nähtavatele kahjustustele. Organeid ja kudesid, milles suure kontsentratsiooni rühma isenditel leiti kahjustusi, tuleks uurida kõigi rühmade isenditel. Uuringu juht võib otsustada teha histopatoloogilised hindamised täiendavate rühmade puhul, et tõendada selget sõltuvust kontsentratsioonist. Kui kasutatakse satelliitrühma (pöörduvuse rühma), tuleks teha kõigi selliste kudede ja organite histopatoloogiline hindamine, milles katserühmade indiviididel leiti muutusi. Kui suure kokkupuute rühmas sureb liiga palju loomi varajases etapis või tekib muid probleeme, mis muudavad andmete tähenduse ähmaseks, tuleks histopatoloogiliselt uurida järgmise väiksema kontsentratsiooni rühma. Tuleks püüda omavahel seostada üldisi tähelepanekuid ja mikroskoopilisi leide.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmed**

44. Iga looma kohta tuleks esitada kehamassi, sööda tarbimise, kliinilise patoloogia, üldpatoloogia, organite massi ja histopatoloogia andmed. Kliiniliste vaatluste andmed tuleks esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates iga katserühma puhul ära osalenud loomade arvu, konkreetsete mürgistusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnuna leitud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahanguleiud. Kõiki tulemusi, nii kvantitatiivseid andmeid kui ka üksiktähelepanekuid, tuleks sobiva statistilise meetodi abil hinnata. Võib kasutada kõiki üldtunnustatud statistilisi meetodeid; statistilised meetodid tuleks valida juba uuringu kavandamisel.

Katseprotokoll

45. Katseprotokoll peaks sisaldama võimaluse korral järgmist teavet.

Katseloomad ja pidamistingimused

— Puuringimuste kirjeldus, sh: loomade arv (või arvu muutus) puuri kohta, allapanu, õhu temperatuur ja suhteline õhuniiskus, valgustusperiood ja sööt.

▼ **M4**

— Kasutatud liik/liin ja muu liigi kui roti kasutamise põhjendus. Võib esitada lähteandmed ja varasemad andmed, kui need on saadud loomade kohta, kes viidi kemikaaliga kokkupuutesse samasugustes kokkupuute-, pidamis- ja nälgimistingimustes.

— Loomade arv, vanus ja sugu.

— Randomiseerimismeetod.

— Kõigi eelnenud ettevalmistamismeetmete kirjeldus, sh söötmine, karantiin ja haiguste ravi.

Uuritav kemikaal

— Füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalises-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerne koostis).

— Identifitseerimisandmed, Chemical Abstract Services Registry ehk CASi nr, kui see on teada.

Kandeaine

— Kandeaine kasutamise põhjendus ja kandeaine valiku põhjendus (kui kandeainena ei kasutata vett).

— Varasemad või rööpandmed, millega tõendatakse, et kandeaine ei mõjuta uuringu tulemusi.

Inhalatsioonikamber

— Inhalatsioonikambri üksikasjalik kirjeldus, sh selle mahu andmed ja joonis.

— Loomade kokkupuute jaoks kasutatavate seadmete päritolu ja kirjeldus ning samuti keskkonna tekitamise kirjeldus.

— Temperatuuri, niiskuse, osakeste suuruse ja tegeliku kontsentratsiooni mõõtmise seadmed.

— Õhuallikas ja õhu konditsioneerimiseks kasutatav süsteem.

— Homogeense katsekeskkonna tagamise seadmete kalibreerimisel kasutatud meetodid.

— Rõhuvahe (positiivne või negatiivne).

— Kokkupuuteportide arv kambri kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude); loomade paiknemine kambri (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).

— Katsekeskkonna (atmosfääri) stabiilsus.

— Temperatuuri- ja niiskusandurite paigutus ning katsekeskkonnast proovide võtmine kambri.

— Sissejuhitud ja väljatõmmatud õhu töötlemine.

— Õhuvoolu kiirused, õhuvoolu kiirus kokkupuutepordi kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude) või loomade hulk kambri kohta (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).

— Inhalatsioonikambri tasakaaluseisundini jõudmiseks vajalik aeg (t_{95}).

— Kogu kambri oleva õhu vahetuste arv tunnis.

— Mõõteseadmed (vajaduse korral).

Andmed kokkupuute kohta

— Põhiuuringu sihtkontsentratsiooni valimise põhjendus.

▼ M4

- Nimikontsentratsioonid (inhalatsioonikambri suunatud uuritava kemikaali kogumass, mis on jagatud läbi kambri juhitud õhu kogusega).
- Uuritava kemikaali tegelikud kontsentratsioonid loomade hingamistsoonist kogutud proovides; heterogeensel füüsilisel kujul esineva segu (gaas, aur, aerosool) puhul võidakse iga faasi eraldi analüüsida.
- Kõik õhukontsentratsioonid tuleks teatada massiühikuna (mg/l, mg/m³ jne), mitte mahuühikuna (ppm, ppb jne).
- Osakeste suurusjaotus, massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) ja geomeetiline standardhälve (σ_g) ning nende arvutamise meetodid. Tuleks teatada üksikosakeste suuruse analüüsid.

Katsetingimused

- Üksikasjalikud andmed uuritava kemikaali ettevalmistamise kohta, sh andmed meetmete kohta, mida kasutati tahke aine osakeste suuruse vähendamiseks või uuritava kemikaali lahuste valmistamiseks.
- Katsekeskkonna tekitamiseks ja loomade kokkupuuteks katsekeskkonnaga kasutatud seadmete kirjeldus (eelistatult koos joonisega).
- Kambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoo jälgimiseks kasutatud seadmete üksikasjad (st kalibreerimiskõvera koostamine).
- Kambrikontsentratsiooni ja osakeste suurusjaotuse määramise proovide kogumise seadmete andmed.
- Kasutatud keemilise analüüsi meetodi ja selle valideerimise üksikasjad (sh uuritava kemikaali analüütiline saagis proovivõtukeskkonna analüüsimisel).
- Loomade katse- ja kontrollrühma määramiseks kasutatud randomiseerimismeetod.
- Üksikandmed sööda ja vee kvaliteedi kohta (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas).
- Katsekontsentratsioonide valiku põhjendus.

Tulemused

- Tabelid katsekambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoolu kohta.
- Tabelid kambri nimi- ja tegeliku kontsentratsiooni andmete kohta.
- Tabelid osakeste suurusjaotuse kohta, sh analüüsiproovide võtmise andmed, osakeste suurusjaotus ning MMAD ja σ_g arvutamine.
- Tabelid iga looma reageerimise ja kontsentratsioonide kohta (st mürgistusnähtudega loomad, kaasa arvatud surnud loomad, mõjude laad, raskus, ilmumise aeg ja kestus).

▼M4

- Tabelid iga katselooma kehamassi kohta.
- Tabelid sööda tarbimise kohta.
- Tabelid kliinilise patoloogia andmete kohta.
- Iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.
- Tabelid kõigi muude mõõdetud näitajate kohta.

Tulemuste arutelu ja tõlgendamine

- Eritähelepanu tuleks pöörata selliste meetodite kirjeldamisele, mida kasutati käesoleva katsemeetodi kriteeriumide täitmiseks, näiteks piirkontsentratsioon või osakeste suurus.
- Üldtulemuste alusel tuleks käsitleda küsimust, kas osakeste suurus oli sobiv sissehingamiseks, eelkõige siis, kui osakeste suuruse kriteeriume ei olnud võimalik täita.
- Uuringu üldhinnangus tuleks käsitleda nimi- ja tegelike kontsentratsioonide kindlaksmääramiseks kasutatud meetodite kooskõllisust ning tegeliku ja nimikontsentratsiooni vahelist seost.
- Tuleks käsitleda tõenäolist surma põhjust ja uuritava kemikaali peamist toimeviisi (süsteemne või lokaalne).
- Kui OECD humaansete lõpetamiskriteeriumide juhenddokumendis (3) sätestatud kriteeriumide alusel tekkis vajadus humaansele viisil surmata valu kannatavaid või tõsiste ja püsivate kannatuste tunnustega loomi, siis tuleks esitada selgitus.
- Tuleks kindlaks teha sihtorgan(id).
- Tuleks määrata kindlaks täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) ja väikseim täheldatavat kahjulikku toimet avaldav kontsentratsioon (LOAEL).

KIRJANDUS

- 1) OECD (1981). Subchronic Inhalation Toxicity Testing, Original Test Guideline No 412, Environment Directorate, OECD, Paris.
- 2) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- 3) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- 4) Whalan JE and Redden JC (1994). Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.
- 5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology (Chapter 9) in Toxicology of Inhaled Material, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229–258.
- 6) Young JT (1981). Histopathological examination of the rat nasal cavity. Fundam. Appl. Toxicol. 1: 309–312.
- 7) Harkema JR (1990). Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. Environ. Health Perspect. 85: 231–238.

▼M4

- 8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.
- 9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353–372.
- 10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hamelers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219–224.
- 11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140–141: 281–285.
- 12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419–428.
- 13) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼ **M4**

1. liide

MÕISTE

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼B

- B.9. KORDUSDOOSI MÜRGISUS (28 PÄEVA, NAHAKAUDNE)**
- 1. MEETOD**
- 1.1. SISSEJUHATUS**
Vt B osa üldist sissejuhatust (A).
- 1.2. MÕISTED**
Vt B osa üldist sissejuhatust (B).
- 1.3. VÕRDLUSAINED**
Puuduvad.
- 1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**
Testainet kantakse 28 päeva jooksul iga päev astmeliste annustena mitme rühma katseloomade nahale nii, et üks rühm saab ühesuguse annuse. Manustamisperioodil jälgitakse loomi iga päev, et kontrollida mürgistusnähtude ilmumist. Katse jooksul surnud loomad lahatakse, katse lõpus surmatakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.
- 1.5. KVALITEEDINÕUDED**
Puuduvad.
- 1.6. MEETODI KIRJELDUS**
- 1.6.1. Ettevalmistused**
Loomi hoitakse enne katset vähemalt viis päeva katsele vastavatel pidamis- ja söötmistingimustel. Noored terved katseloomad randomiseeritakse enne katset ja jagatakse katse- ja kontrollrühmadesse. Vahetult enne katset eemaldatakse pügamise teel katselooma keha seljaosalt karvkate. Kasutada võib ka raseerimist, seda tuleks teha 24 tundi enne katset. Korduspügamist või -raseerimist on tavaliselt vaja ligikaudu nädalaste vahedega. Karvkate pügamisel või raseerimisel tuleb vältida naha marrastamist. Testaine nahale kandmiseks tuleb vabastada vähemalt 10 % kehapinnast. Vabastatava ala ja katte mõõtmete valikul tuleks arvesse võtta looma massi. Tahkete, vajaduse korral peenestatud ainete puhul tuleks testainet nahaga hea kokkupuute saavutamiseks niisutada piisava koguse vee või sobiva kandjaga. Vedelaid testaineid kasutatakse üldjuhul lahjendamata kujul. Testainet kantakse nahale kord päevas, 5–7 päeval nädalas.
- 1.6.2. Katsetingimused**
- 1.6.2.1. Katseloomad**
Kasutada võib täiskasvanud rott, küülikut või merisiga. Kasutada võib ka muid liike, kuid seda tuleb põhjendada.

▼B

Kasutatavate katseloomade masside erinevus katse alguses ei tohiks ületada ± 20 % vastavast keskmisest.

1.6.2.2. *Katseloomade arv ja sugu*

Iga uuritavat annusemäära katsetakse vähemalt kümnel terve nahaga loomal (viiel emas- ja viiel isasloomal). Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Kui uuringu jooksul plaanitakse loomi surmata, tuleks loomade arvu enne uuringu lõppu surmamisele määratud loomade arvu võrra suurendada. Lisaks võib testaine kõrgeima annusega mõjutada 28 päeva jooksul üht kümne loomaga (viis looma kummastki soost) satelliitrühma ja jälgida sellel 14 päeva jooksul pärast kokkupuudet mürgistusnähtude pöördumist, püsivust või hilist avaldumist. Kasutatakse ka üht kümne kontrollloomaga (viis looma kummastki soost) satelliitrühma.

1.6.2.3. *Annused*

Kasutatakse vähemalt kolme annusemäära ja kontrolli või kandja kasutamisel kandja kontrolli. Kokkupuuteperioodi kestus peaks olema vähemalt kuus tundi päevas. Testainet tuleks peale kanda iga päev sarnastel kellaaegadel ja annuseid järk-järgult (üks või kaks korda nädalas) reguleerida, et annus jääks looma kehamassi suhtes konstantseks. Testainega töötlemine välja arvatud, tuleks kontrollrühma loomi kohelda samamoodi nagu katserühma loomi. Kui annustamise lihtsustamiseks kasutatakse kandjat, tuleks kandja kontrollrühmale manustada kandjat analoogselt katserühmaga ja nad peaksid saama sama koguse kandjat nagu kõrgeima annusemääraga rühm. Kõrgeim annus peaks põhjustama mürgistusnähte, kuid ei tohiks põhjustada suremust või siis peaks suremus olema väike. Väikseima doosi puhul ei tohiks mürgisust ilmned. Kasutuskõlbliku hinnangulise inimkokkupuute annuse olemasolul peaks madalaim annus olema sellest kõrgem. Ideaaljuhul peaks keskmine annusemäär põhjustama minimaalseid täheldatavaid mürgistusnähte. Rohkem kui ühe vahepealse annuse kasutamisel peaks annusemäärad jaotuma nii, et tekkivad mürgistusnähud jaotuvad astmeliselt. Tulemuste usaldusväärse hindamise võimaldamiseks peaks suremus madala ja vahepealsete annusemääradega ning kontrollrühmades olema madal.

Kui testaine nahale kandmine toob kaasa tugeva nahaärrituse, tuleks kontsentratsiooni vähendada; selle tulemuseks võib olla muude mürgistusnähtude vähenemine või puudumine kõrgeima annusemäära kasutamisel. Lisaks võib tõsiste nahakahjustuste ilmnemisel olla vaja uuring lõpetada ja teha madalamatel kontsentratsioonidel uus uuring.

1.6.2.4. *Piirsalduskatse*

Kui eelkatse annusemääraga 1 000 mg/kg või kõrgema, võimaliku teadaoleva inimkokkupuute kontsentratsiooniga seotud annusemääraga ei kutsu esile mürgistusnähte, võib edasise kontrollimise lugeda tarbetuks.

1.6.2.5. *Vaatlusperiood*

Kõigil katseloomadel tuleb iga päev jälgida mürgistusnähtude ilmnemist. Mürgistusnähtude ilmnemise ja kadumise ning surma aeg on väga olulised ning tuleks registreerida.

▼B**1.6.3. Katse käik**

Loomi tuleks puurides pidada ühekaupa. Testainet kantakse loomade nahale 28 päeva jooksul, ideaaljuhul 7 päeval nädalas. Mis tahes satelliitühma loomadele, kellega planeeritakse hilisemaid vaatlusi, ei tohiks järgneva 14 päeva jooksul ainet manustada, et kontrollida mürgistusnähtudest paranemist või nende püsivust. Kokkupuute kestus peaks olema vähemalt kuus tundi päevas.

Testaine tuleks kanda ühtlaselt alale, mis moodustab ligikaudu 10 % kogu kehapinnast. Väga mürgiste ainete puhul võib katta väiksema osa kehapinnast, kuid võimalikult suur osa pinnast tuleks katta võimalikult õhukese ja ühtlase kihiga.

Testainet tuleks kokkupuuteperioodi jooksul hoida poorse marlisideme ja mitteärritava kleelindi abil naha vastas. Manustamiskoht tuleks veel lisaks sobival moel kinni katta, et hoida marlisidet ja testainet paigal ja vältida testaine allaneelamist katselooma poolt. Et vältida testaine allaneelamist, võib kasutada looma liikuvust piiravaid vahendeid, kuid looma täielikku fikseerimist ei soovitata. Kasutada võib ka kaitsekraed.

Kokkupuuteperioodi lõpus tuleks testaine jääk nahalt võimaluse korral veega või muu sobiva puhastusmeetodi abil eemaldada.

Kõiki loomi tuleb iga päev jälgida ja registreerida kõik mürgistusnähud ja nende ilmnemise aeg, raskusaste ja kestus. Vaadelda tuleks muutusi nii nahas ja karvkattes, silmades ja limaskestades kui ka hingamis- ja vereringeelundkonnas, autonoomses ja kesknärvisüsteemis ning somatomotoorses aktiivsuses ja käitumises. Loomi tuleks iga nädal kaaluda. Soovitav on iga nädal mõõta ka toidu tarbimist. Loomi tuleb regulaarselt vaadelda, et võimaluse piires vältida loomade kadu sellistel põhjustel nagu kannibalism, kudede autolüüs või loomade kaotsimine nende ümberpaigutamisel. Uuringuperioodi lõpus surmataks ja lahatakse kõik ellujäänud loomad, v.a satelliitühma loomad. Surevad ja tõsistes kannatustes või valudes loomad tuleks avastamisel kõrvaldada, humaanselt surmata ja lahata.

Kõigile loomadele, sh kontrollühma loomadele, tehakse katseperioodi lõpus järgmine uuring:

- 1) hematoloogia, sealhulgas vähemalt hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide üld- ja suhtarv ja hüübimisvõime;
- 2) kliiniline verebiokeemia, sh vähemalt üks maksa ja neerude funktsiooni parameeter:alaniini aminotransferaas (varem tuntud glutamaatpüruvaadi transaminaasina), seerumi aspartaadi aminotransferaas (varem tuntud glutamaatoksaloatsetaadi transaminaasina, kusiainelämmastik, albumiin, kreatiniin, üldbilirubiin ja seerumi üldvalk.

Muud analüüsinaidud, mida võib pädeva toksikoloogilise hinnangu andmiseks vaja minna, on järgmised: kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, veresuhkur (tühja kõhuga), lipiidianalüüs, hormoonid, happe/aluse tasakaal, methemoglobiin ja koluni esteraasi aktiivsus.

▼B

Vajaduse korral võib vaadeldava toime põhjalikumaks uurimiseks kasutada täiendavaid kliinilisi biokeemilisi näitajaid.

1.6.4. **Üldlahang**

Kõik katseloomad tuleks üleni lahata. Vähemalt maks, neerud, neeru-pealised ja munandid tuleks kohe pärast lahti lõikamist kuivamise vältimiseks märjalt kaaluda. Elundid ja koed, st normaalne ja töödeldud nahk, maks, neerud, põrn, munandid, neerupealised, süda ja muud sihtelundid (see tähendab makropatoloogiliste kahjustustega või muutunud suurusega elundid) tuleks säilitada sobivas keskkonnas võimaliku hilisema histopatoloogilise uuringu jaoks.

1.6.5. **Histopatoloogiline uuring**

Kõrgeima annusega rühma ja kontrollrühma loomade säilitatud elundeid ja kudesid tuleks histoloogiliselt uurida. Kõrgeima annusega rühmal testainega seostatavaid kahjustusi sisaldavaid elundeid ja kudesid tuleks kontrollida ka kõigil madalama annusega rühmadel. Võimaliku satelliitrühma loomi tuleks samuti histoloogiliselt uurida, pöörates eriti tähelepanu nendele elunditele ja kudedele, milles muudes katserühmades esines muutusi.

2. **ANDMED**

Andmed tuleks esitada kokkuvõtlikus tabelis, mis iga katserühma puhul näitab katseloomade arvu selle katse algul ja igat tüüpi kahjustustega loomade arvu.

Kõiki vaatlustulemusi tuleks hinnata sobiva statistilise meetodi abil. Kasutada võib kõiki tunnustatud statistilisi meetodeid.

3. **ARUANDLUS**3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- katseloomade kohta käivaid andmeid (liiki, liini, päritolu, keskkonnatingimusi, toidusedelit jne);
- katsetingimusi (sealhulgas sideme tüüpi: oklusiivside või tavaline side);
- annuseid (kandja kasutamisel koos kandjaga) ja kontsentratsioone;
- võimaluse korral toimeta annust;
- mürgistusnähtude andmeid soo ja annuse järgi;
- surmahetke katse ajal või seda, kas loomad jäid kuni surmamiseni ellu;
- mürgistus- või muid nähte;
- iga kõrvalekalde täheldamise aega ja kõrvalekalde hilisemat kulgu;
- sööda ja kehakaalu andmeid;
- kasutatud hematoloogilisi analüüse ja nende tulemusi;

▼B

- kasutatud kliinilise biokeemia analüüse ja nende tulemusi;
- lahkamistulemusi;
- kõigi histopatoloogiliste leidude üksikasjalikku kirjeldust;
- võimaluse korral tulemuste statistilist käsitlust;
- tulemuste analüüsi;
- tulemuste tõlgendust.

3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Vt B osa üldist sissejuhatust (D).

4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust (E).

▼B**B.10. MUTAGEENSUS – IMETAJATE KROMOSOOMABERRAT-SIOONKATSE *IN VITRO*****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 473, *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

In vitro kromosoomaberratsioonkatse eesmärgiks on kindlaks määrata ained, mis põhjustavad struktuurseid kromosoomaberratsioone kultiveeritud imetajarakkudes (1, 2, 3). Struktuursed aberratsioonid võivad olla kahte tüüpi: kromosoom- või kromatiidaberratsioonid. Keemiliste mutageenide põhjustatud aberratsioonid on enamasti kromatiidaberratsioonid, aga esineb ka kromosoomaberratsioone. Polüploiduse suurenemine võib viidata sellele, et kemikaal võib esile kutsuda numbrilisi aberratsioone. Käesolev meetod ei võimalda siiski mõõta numbrilisi aberratsioone ja seda ei kasutata sel eesmärgil korrapäraselt. Kromosoommutatsioonid ja nendega seotud juhud on süüdi paljudes inimeste geneetilistes haigustes ja on olemas olulisi tõendeid, et kromosoommutatsioonid ja nendega seotud juhud, mis põhjustavad muutusi keharakkude onkogeenides ja kasvaja supressorgeenides, osalevad vähktõve tekkes inimestel ja katseloomadel.

In vitro kromosoommutatsiooni katsetes võib kasutada loodud raku-liinide kultuure, rakutüvesid või primaarsete rakkude kultuure. Kasutatavad rakud valitakse rakkude kasvuvõime, kartuotüüpide püsivuse, kromosoomiarvu, kromosoomide mitmekesisuse ja kromosoomaberratsioonide spontaanse sageduse põhjal.

Läbiviidud *in vitro* katsed üldjuhul nõuavad eksogeenset metaboolset aktiveerimist. Kõnealune metaboolse aktiveerimise süsteem ei saa tervenisti jäljendada *in vivo* tingimusi imetajatel. Tuleb hoolt kanda selle eest, et välditakse positiivseid tulemusi põhjustavaid tingimusi, mis ei peegelda looduslikku mutageensust ja võivad tuleneda pH muutustest, osmolaalsusest või tsütotoksilisuse kõrgetest tasemetest (4, 5).

Kõnealust katset kasutatakse imetajate võimalike mutageenide ja kantserogeenide skriinimiseks. Mitmed ühendid, mis annavad kõnealuses katsetes positiivseid tulemusi, on imetajate kantserogeenid; siiski ei ole kõnealuse katse ja kantserogeensuse vahel täielikku korrelatsiooni. Korrelatsioon sõltub ühendi keemilisest klassist ja üha enam uurimistulemusi viitab sellele, et on olemas kantserogeenid, mida kõnealuse katse abil ei avastata, kuna need näivad mõjuvat muude mehhanismide kui otsese DNA kahjustuse kaudu.

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

1.2. MÕISTED

Kromatiidaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis ilmneb üksikute kromatiidide katkemises või kromatiididevahelises katkemises ja taasühinemises.

Kromosoomaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis ilmneb mõlema kromosoomi katkemises või mõlema kromatiidi samas kohas katkemises ja taasühinemises.

▼B

Endoreduplikatsioon – protsess, milles pärast DNA replikatsiooni S-faasi tuum ei lähe mitoosi, vaid algab uus S-faas. Selle tulemusena tekivad kromosoomid, milles on 4, 8, 16, ... kromatiidi.

Tühik – akromaatileine kahjustus, mis on väiksem kui kromatiidi laius ja millel on kromatiidide orientatsiooni erinevus minimaalne.

Mitootiline indeks – metafasis olevate rakkude arv jagatakse raku-populatsioonis vaadeldud rakkude koguarvuga; näitab rakkude proliferatsiooni astet kõnealusel populatsioonis.

Numbriline aberratsioon – kasutatud rakkude tüüpilisest kromosoomiarvust erinev kromosoomide arv.

Polüploidus – haploidse kromosoomiarvu (n) kordsus, v.a diploidne kromosoomiarv (nt $3n$, $4n$ jne).

Struktuurine aberratsioon – kromosoomstruktuuri muutus, mis on avastatav raku jagunemise metafasi etapi mikroskoopilisel uurimisel ja mida täheldatakse deletsiooni ja fragmentidena, kromosoomisest või -väliste muutustena.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Rakukultuurid allutatakse uuritava aine toimele nii metaboolse aktiveerimise tingimustes kui ka ilma selleta. Pärast rakukultuuridele uuritava ainega toimimist töödeldakse neid kindlaksmääratud ajavahemike järel metafasi peatava ainega (nt Colcemid® või kolhitsiin), rakud kogutakse ja värvitakse ning metafasis olevaid rakke analüüsitakse mikroskoopiliselt kromosoomaberratsioonide suhtes.

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. Ettevalmistused

1.4.1.1. Rakud

Katses võib kasutada erinevaid rakuliine, rakutüvesid või primaarsete rakkude kultuure, sh inimrakke (nt hiina hamstri fibroplaste, inimeste või muude imetajate perifeerse vere lümfotsüüte).

1.4.1.2. Kasvukeskkonnad ja söötmed

Rakukultuuride säilitamiseks tuleks kasutada vastavaid kasvukeskkondi ja inkubeerimistingimusi (kasvunõud, CO_2 kontsentratsioon, temperatuur ja niiskus). Püsivaid rakuliine ja -tüvesid tuleb kontrollida regulaarselt modaalse kromosoomiarvu stabiilsuse ning mükoplasma saastumise puudumise suhtes; kui see on saastunud, siis ei tohiks seda kasutada. Rakkude normaalse rakutsükli kestus ja kasutatavad kasvutingimused peaksid teada olema.

1.4.1.3. Rakukultuuride valmistamine

Püsivad rakuliinid ja -tüved: rakud paljundatakse tüvikultuuridest, mis on külvatud kasvukeskkonda sellise tihedusega, et rakukultuurid ei saavuta konfluentsust enne kogumisaega, ja inkubeeritakse $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ juures.

▼B

Lümfotsüüdid: antikoagulandiga (nt hepariin) töödeldud täisveri või tervetelt isenditelt saadud eraldatud lümfotsüüdid lisatakse mitogeeni (nt fütohemaglutiniini) sisaldavale kasvukeskkonnale ja inkubeeritakse 37 °C juures.

1.4.1.4. *Metaboolne aktiveerimine*

Rakud allutatakse uuritava aine toimele nii vastava metaboolse aktiveerimissüsteemi olemasolu kui ka puudumise korral. Enim kasutatav süsteem on ensüüme indutseerivate ainete, nt Aroclor 1254ga (6, 7, 8, 9) või fenobarbitooni ja β -naftoflavooni seguga (10, 11, 12) töödeldud näriliste maksast valmistatud postmitokondriaalne osa (S9), millele on lisatud kofaktor.

Tavaliselt kasutatakse postmitokondriaalset fraktsiooni kontsentratsiooniga 1–10 mahuprotsenti lõplikus katsekeskkonnas. Metaboolse aktiveerimissüsteemi tingimused võivad sõltuda uuritava keemilise aine klassist. Mõnel juhul on vaja kasutada postmitokondriaalse fraktsiooni rohkem kui üht kontsentratsiooni.

Rida meetodeid, sh geneetiliselt muudetud rakuliini loomine, mis ekspresseerivad teatavaid aktiveerimisensüüme, võivad omada endogeense aktiveerimise võimet. Kasutatavate rakuliinide valik peab olema teaduslikult põhjendatud (nt tsütokroom P450 isoensüümi tähtsus uuritava aine metabolismi puhul).

1.4.1.5. *Uuritav aine/preparaat*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajaduse korral lahjendada enne rakkude töötlemist. Vedelad uuritavad ained võib lisada vahetult katsesüsteemidesse ja/või lahjendada enne töötlemist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

1.4.2. **Katsetingimused**1.4.2.1. *Lahusti/kandjaaine*

Lahusti/kandjaaine ei tohiks uuritava ainega keemiliselt reageerida ning see peaks sobima rakkude eluvõimelisuse ja S9 aktiivsusega. Kui kasutatakse tuntud lahustist/kandjaainest erinevat, siis peab nende kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahusti/-kandjaaine kasutamist. Vees ebapüsivate ainete uurimisel kasutatavad orgaanilised lahustid peavad olema veevabad. Vett saab eemaldada molekulaarsõelte lisamisega.

1.4.2.2. *Toimimiseks kasutatavad kontsentratsioonid*

Suurima kontsentratsiooni määramisel on arvestatavad kriteeriumid tsütotoksilisus, lahustuvus katsesüsteemis ning pH või osmolaalsuse muutused.

Tsütotoksilisus määratakse põhikatses kindlaks nii metaboolse aktiveerimisega kui ka ilma selleta, kasutades sobivaid rakkude puhtuse ja kasvu indikaatoreid, nt konfluentsuse astet, eluvõimeliste rakkude arvu või mitootilist indeksit. Tsütotoksilisust ja lahustuvust võib olla kasulik määrata eelkatses.

▼B

Tuleks kasutada vähemalt kolme analüüsivat kontsentratsiooni. Kui esineb tsütotoksilisust, peaksid need kontsentratsioonid katma vahemiku suurimast kontsentratsioonist vähimani või sellise kontsentratsioonini, mille korral mürgisus puudub; mis tavaliselt tähendab seda, et kontsentratsioonide erinevus üksteisest võib olla mitte rohkem kui vahemikus 2 kuni $\sqrt{10}$ asuv koefitsient. Rakkude kogumise ajal peaks suurima kontsentratsiooni korral ilmne märkimisväärne konfluentsuse astme, rakkude arvu või mitootilise indeksi (kõigi osas rohkem kui 50 %) vähenemine. Mitootiline indeks on üksnes tsütotoksiliste/tsütostaatiliste mõjude kaudne mõõt ja sõltub töötlemisele järgnevalt ajast. Mitootilist indeksit tunnustatakse siiski suspensioonkultuuride puhul, milles muude toksilisust mõõtvate vahendite kasutamine võib olla tülikas ja ebapraktiline. Teavet rakutsükli kineetika kohta, nagu näiteks keskmist generatsiooniaega (AGT), tuleks kasutada lisateabena. AGT on siiski üldine keskmine, mis alati ei too esile hilistunud alampopulatsioonide olemasolu, ning isegi keskmise generatsiooniaja kerge pikenemine võib lükata aberratsioonide optimaalse tõestamisaja palju hilisemaks.

Suhteliselt mittetoksiliste ainete puhul peaks suurim testkontsentratsioon olema 5 µl/ml, 5 mg/ml või 0,01 M, sõltuvalt sellest, milline neist on väiksem.

Suhteliselt lahustumatute ainete puhul, mis ei ole lahustumispiirile vastavast kontsentratsioonist madalamatel kontsentratsioonidel toksilised, peaks suurim kasutatud annus olema lahustumispiiri ületav kontsentratsioon viimases kasvukeskkonnas manustamisperioodi lõpus. Mõnedel juhtudel (nt siis, kui toksilisust esineb üksnes madalaimast lahustumatusekontsentratsioonist kõrgematel kontsentratsioonidel), on soovitatav katseid teha rohkem kui ühe kontsentratsiooniga, millel on nähtav sadestus. On kasulik hinnata lahustuvust töötlemise alguses ja lõpus, kuna lahustuvus katsesüsteemis muutub töötlemise ajal rakkude, S9-seerumi jms mõjul. Lahustumatust saab avastada palja silmaga. Sadestus ei tohiks mõjutada tulemust.

1.4.2.3. *Negatiivsed ja positiivsed kontrollkatsed*

Igas uuringus kasutatakse paralleelseid positiivseid ja negatiivseid (lahusti või kandjaaine) kontrollkatseteid koos metaboolse aktiveerimisega või ilma selleta. Kui kasutatakse metaboolset aktiveerimist, käsitatakse positiivse kontrollainena sellist kemikaali, mis eeldab aktiveerimist mutageense reaktsiooni saamiseks.

Positiivsed kontrollkatsed peaksid kasutama tuntud elastogeeni toimimistasemetel, mis ootuspäraselt peaks reprodutseeritavust ja avastatavust suurendama fooniga võrreldes, mis näitab katsesüsteemi tundlikkust.

Kontsentratsioonid positiivsetes kontrollkatsetes valitakse sellised, et mõjud on selged, kuid neist ei ilmne riideris kohe kodeeritud objektiklaaside identsus. Positiivsete kontrollainete näited:

Metaboolse aktiveerimise tingimus	Aine	CASi nr	EINECSi nr
Eksogeense metaboolse aktiveerimise puudumine	Metüülmetaansulfonaat	66-27-3	200-625-0
	Etüülmetaansulfonaat	62-50-0	200-536-7

▼B

Metaboolse aktiveerimise tingimus	Aine	CASi nr	EINECSI nr
	N-etüül-N-nitrosokarbamiid	759-73-9	212-072-2
	Mitomütsiin-C	50-07-7	200-008-6
	4-nitrokinoliin-N-oksiid	56-57-5	200-281-1
Eksogeense metaboolse aktiveerimise olemasolu	Benso(α)püreen	50-32-8	200-028-5
	Tsüklofosfamiid	50-18-0	200-015-4
	Tsüklofosfamiidmonohüdraat	6055-19-2	

Võidakse kasutada muid sobivaid positiivseid kontrollaineid. Samasse keemiliste ainete klassi kuuluvate positiivsete kontrollkemikaalide kasutamist tuleks kaaluda, kui sellised ained on kättesaadavad.

Igal kogumisperioodil võetakse ka negatiivsetest kontrollkatsetest proovid, mis koosnevad üksnes kasvukeskkonnas olevast lahustist või kandjaainest ning mida on töödeldud samal viisil kui kasvukultuure. Lisaks sellele kasutatakse ka töötlemata kontrollproove, välja arvatud juhul, kui varasemad kontrollandmed näitavad, et valitud lahustil ei indutseeri kahjulikke ega mutageenseid mõjusid.

1.4.3. Menetlus

1.4.3.1. Töötlemine uuritava ainega

Paljunevaid rakke töödeldakse uuritava ainega nii metaboolse aktiveerimise süsteemis kui ka ilma selleta. Lümfotsüütide töötlemist alustatakse ligikaudu 48 tundi pärast mitogeenset stimulatsiooni.

1.4.3.2. Tavaliselt tuleks kasutada iga kontsentratsiooni korral paralleelseid kultuure ja see on rangelt soovitatav negatiivsete/lahusti kontrollkultuuride puhul. Kui varasemad andmed näitavad, et paralleelkultuuride vahel on väike erinevus (13, 14), siis võib olla vastuvõetav iga kontsentratsiooni korral ühe kultuuri kasutamine.

Gaasilisi või lenduvaid aineid uuritakse sobiva meetodi abil, näiteks suletud kasvuanumates (15, 16).

1.4.3.3. Kultuuride kogumise aeg

Esimeses katses alluvad rakud uuritava aine toimele nii metaboolse aktiveerimise teel kui ka ilma selleta 3–6 tunni jooksul ning proovid võetakse pärast töötlemise algust (12) ajal, mis vastab ligikaudu 1,5 normaalse rakutsükli kestusele. Kui kõnealusel meetodil saadakse negatiivsed tulemused nii aktiveerimisega kui ka ilma selleta, tehakse uus katse ilma aktiveerimiseta ja töötlemist jätkatakse kuni proovivõtmise hetkeni, mis vastab ligikaudu 1,5 normaalse rakutsükli kestusele. Teatud keemilisi aineid saab hõlpsamini avastada, kui töötlemis-/proovivõtuaeg on pikem kui 1,5 rakutsükli. Metaboolse aktiveerimise korral saadud negatiivseid tulemusi tuleb kooskõlastada igal üksikjuhul eraldi. Neil juhtudel, kui negatiivsete tulemuste kooskõlastamist ei peeta vajalikuks, esitatakse põhjendus.

▼B1.4.3.4. *Kromosoomipreparaatide valmistamine*

Rakukultuure töödeldakse ainega Colcemid® või kolhitsiiniga tavaliselt 1–3 tundi enne kogumist. Iga rakukultuuri kogutakse ja töödeldakse eraldi kromosoomipreparaatide jaoks. Kromosoomipreparaatide valmistamise alla kuulub rakkude hüpotooniline töötlemine, fikseerimine ja värvimine.

1.4.3.5. *Analüüs*

Kõik objektiklaasid, sh positiivsete ja negatiivsete kontrollkatsete omad, kodeeritakse sõltumatult enne mikroskoopilist analüüsi. Kui fikseerimismenetlused viivad tihti metafasis olevate rakkude suhte rikkumiseni ja kromosoomide kaotamiseni, peaksid seega loetud rakud sisaldama tsentromeere koguses, mis vastab modaalarvule ± 2 kõikide rakutüüpide korral. Iga kontsentratsiooni ja kontrollkatse puhul tuleb lugeda vähemalt 200 hästi levinud metafasi, mis on võrdselt jaotunud paralleelkultuuride vahel, kui neid kasutatakse. Seda arvu saab vähendada, kui täheldatakse palju aberratsioone.

Kuigi katse eesmärk on avastada struktuursed kromosoomaberratsioonid, on tähtis registreerida ka polüploidus ja endoreduplikatsioon, kui need esinevad.

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Katseühikuks on rakk, mistõttu hinnatakse nende rakkude protsendimäära, milles on struktuurne kromosoomaberratsioon või struktuursed kromosoomaberratsioonid. Eri tüüpi struktuursed kromosoomaberratsioonid loetletakse koos nende arvukuse ja esinemissagedusega katse- ja kontrollkultuurides. Tühikud registreeritakse eraldi ja nende kohta antakse teavet, aga üldiselt ei arvestata neid aberratsioonide üldsageduse hulka.

Samuti registreeritakse kõikides töödeldud ja negatiivsetes kontrollkultuurides tehtud samaaegsed tsütotoksilisuse mõõtmised peamistes aberratsioonikatsetes.

Tulemused esitatakse iga üksiku kultuuri kohta. Lisaks esitatakse kokkuvõtte kõikidest tulemustest tabeli kujul.

Selget positiivset vastust ei ole vaja verifitseerida. Ebaselgeid tulemusi tuleks selgitada täiendaval uurimisel muudetud katsetingimustes. Vajadust negatiivsete tulemuste kinnitamise järele on arutatud punktis 1.4.3.3. Katse parameetrite muutmist hinnatud tingimuste vahemiku laiendamiseks tuleb arvesse võtta järelkatsetel. Katse parameetrite, mida võidakse muuta, hulka kuuluvad kontsentratsioonivahemik ja metaboolse aktiveerimise tingimused.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÖLGENDAMINE

On mitmeid kriteeriume positiivse tulemuse määramiseks, nagu nt kontsentratsioonist sõltuv kromosoomaberratsioonide sisaldavate rakkude arvu suurenemine või selle reprodutseeruv kasv. Tulemuste bioloogilist tähtsust tuleks esmalt arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel (3, 13). Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse jaoks.

▼B

Polüploidsete rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et katseainel on võime inhibeerida mitoosiprotsessi ja põhjustada numbrilisi kromosoomaberratsioone. Endoreduplitseeritud kromosoomide sisaldavate rakkude arvu suurenemine võib viidata sellele, et uuritav aine võib takistada rakutsükli progressi (17, 18).

Uuritavat ainet, mille tulemused ei vasta eespool toodud kriteeriumidele, peetakse mittemutageenseks aineks käesolevas süsteemis.

Kuigi enamikul katsetest on selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad saadud tulemused harvadel juhtudel kindlate otsuste tegemise uuritava aine aktiivsuse kohta. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud korduskatsete arvust hoolimata.

In vitro kromosoomaberratsiooni katse positiivsed tulemused viitavad sellele, et uuritav aine põhjustab struktuurseid kromosoomaberratsioone imetajate kultiveeritud keharakkudes. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et katsetingimuste põhjal ei põhjusta uuritav aine kromosoomaberratsioone imetajate kultiveeritud keharakkudes.

3. ARUANDLUS

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Lahusti/kandjaaine:

- kandjaaine valiku põhjendamine;
- uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui on teada.

Rakud:

- rakkude tüüp ja allikas;
- karütotüübi omadused ja kasutatava rakutüübi sobivus;
- mükoplasma puudumine, vajaduse korral;
- teave rakutsükli pikkuse kohta;
- veredoonorite sugu, täisveri või eraldatud lümfotsüüdid, kasutatav mitogeen;
- passaažide arv, vajaduse korral;
- rakukultuuri säilitamise meetodid, vajaduse korral;
- kromosoomide modaalarv

Katsetingimused:

- metafaasi peatav aine, selle kontsentratsioon ja rakule toimimise kestus;
- kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valimise põhimõtted, sh nt tsütotoksilisuse andmed ja lahustuvuse piirangud, kui need on olemas;
- kasvukeskkonna koostis, CO₂ kontsentratsioon, vajaduse korral;

▼B

- uuritava aine kontsentratsioon;
- lisatud kandjaaine ja uuritava aine maht;
- inkubatsioonitemperatuur;
- inkubatsiooniaeg;
- töötlemise kestus;
- rakutihedus külvamisel, vajaduse korral;
- metaboolse aktiveerimise süsteemi tüüp ja koostis, sh selle vastuvõetavuse kriteeriumid;
- positiivsed ja negatiivsed kontrollkatsed;
- objektiklaaside valmistamise meetodid;
- aberratsioonide loendamise kriteeriumid;
- analüüsitud metafaaside arv;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- kriteeriumid, mille alusel uuringuid liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks.

Tulemused:

- toksilisuse tunnused, nt konfluentsuse aste, rakutsükli käsitlev teave, rakkude loendused, mitootiline indeks;
- sadestumise tunnused;
- teave kasvukeskkonna pH ja osmolaalsuse kohta, kui see on määratud;
- aberratsioonide, sh tühikute määratlemine;
- kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude arv ja kromosoomaberratsioonide tüüp, mis on toodud eraldi iga katse- ja kontrollkultuuri kohta;
- ploidsuse muutused, kui neid esineb;
- doosi ja toime vaheline sõltuvus, võimaluse korral;
- võimalikud statistilised analüüsid;
- paralleelsete negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollide tulemused;
- varasemate negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollkatsete andmed, sh vahemik, keskvärtused ja standardhälbed.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

- 1) Evans, H. J. (1976), Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens, in: Chemical mutagens, Principles and Methods for their Detection, Vol. 4, Hollaender, A. (ed) Plenum Press, New York and London, pp. 1–29.
- 2) Ishidate, M. Jr. and 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, pp. 427–432.

▼B

- 3) Galloway, S. M., Armstrong, M. J., Reuben, C, Colman, S., Brown, B., Cannon, C, Bloom, A. D., Naka-mura, F., Ahmed, M., Duk, S., Rimpo, J., Margolin, G. H., Resnick, M. A., Anderson, G. and Zeiger E. (1978), Chromosome aberration and sister chromatic exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluation of 108 chemicals, *Environ. Molec. Mutagen* 10 (suppl.10), pp. 1–175.
- 4) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M. Jr., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.*, 257, pp. 147–204.
- 5) Morita, T., Nagaki, T., Fukuda, I. and Okumura, K., (1992), Clastogenicity of low pH to Various Cultured Mammalian Cells, *Mutation Res.*, 268, pp. 297–305.
- 6) 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, pp. 347–364.
- 7) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173–215.
- 8) Natarajan, A. T., Tate, A. D., van Buul, P. P. W., Meijers, M. and 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 Diethylnitrosamine (DEN) and Dimethylnitrosamine (DMN) in CHO Cells in the Presence of Rat-Liver Microsomes, *Mutation Res.*, 37, pp. 83–90.
- 9) Matsuoka, A., Hayashi, M. and Ishidate, M. Jr. (1979), Chromosomal Aberration Tests on 29 Chemicals Combined with S9 Mix *In Vitro*, *Mutation Res.*, 66, pp. 277–290.
- 10) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Report of UK Environmental Mutagen Society Working Party. Alternative to Aroclor 1254-induced S9 in *In Vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175–177.
- 11) 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, pp. 85–88.
- 12) Galloway, S. M., Aardema, M. J., Ishidate, M. Jr., Ivett, J. L., Kirkland, D. J. Morita, T., Mosesso, P., Sofu-mi, T. (1994), Report from Working Group on *In Vitro* Tests for Chromosomal Aberrations, *Mutation Res.*, 312, pp. 241–261.
- 13) Richardson, C, Williams, D. A., Allen, J. A., Amphlett, G., Chanter, D. O. and Phillips, B. (1989), Analysis of Data from *In Vitro* Cytogenetic Assays, in: Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, Kirkland, D. J., (ed) Cambridge University Press, Cambridge, pp. 141–154.
- 14) Soper, K. A. and Galloway, S. M. (1994), Replicate Flasks are not Necessary for *In Vitro* Chromosome Aberration Assays in CHO Cells, *Mutation Res.*, 312, pp. 139–149.
- 15) 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.

▼B

- 16) 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, pp. 795–801.
- 17) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403–413.
- 18) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362–1364.

▼B**B.11. MUTAGEENSUS – KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE
IMETAJATE LUUÜDIS *IN VIVO*****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 475, Mammalian Bone Marrow Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

Imetajate *in vivo* kromosoomaberratsioonkatset kasutatakse uuritava aine põhjustatud struktuursete kromosoomaberratsioonide avastamiseks imetajate, tavaliselt näriliste luuüdirakkudes (1, 2, 3, 4). Struktuuralsed kromosoomaberratsioonid võivad olla kahte tüüpi: kromosoom- või kromatiidaberratsioonid. Polüploidisuse suurenemine võib viidata sellele, et kemikaal võib esile kutsuda numbrilisi aberratsioone. Keemiliste mutageenide põhjustatud aberratsioonid on enamasti kromatiidaberratsioonid, aga esineb ka kromosoomaberratsioone. Kromosoommutatsioonid ja nendega seotud juhud põhjustavad paljusid inimeste geneetilisi haigusi ja on olemas olulisi tõendeid selle kohta, et kromosoommutatsioonid ja nendega seotud juhud, mis põhjustavad muutusi keharakkude onkogeenides ja kasvaja supressorgeenides, osalevad vähktõve tekkes inimestel ja katseloomadel.

Kõnealuses katses kasutatakse tavaliselt närilisi. Kõnealuses katses on sihtkoeks luuüdi, kuna selle verevarustus on väga rikkalik ja see sisaldab rakupopulatsiooni, mille rakutsükkel on kiire ning mida on kerge isoleerida ja töödelda. Käesoleva meetodi puhul ei kasutata muid liike ega sihtkudesid.

Käesolev kromosoomaberratsioonkatse on eriti oluline mutageensuse ohu hindamisel, kuna see võimaldab arvesse võtta *in vivo* metabolismi, farmakokineetika ja DNA parandamisprotsesside tegureid, kuigi need võivad erineda liigiti ja kudede vahel. *In vivo* katset võidakse samuti kasutada *in vitro* katses avastatud mutageense mõju täiendaval uurimisel.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav aine või reageerimisvõimeline metaboliit ei pääse sihtkoesse, ei ole sobiv kasutada käesolevat katset.

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

1.2. MÕISTED

Kromatiidaberratsioon – struktuurane kromosoomikahjustus, mis ilmneb üksikute kromatiidide katkemises või kromatiididevahelises katkemises ja taasühinemises.

Kromosoomaberratsioon – struktuurane kromosoomikahjustus, mis ilmneb mõlema kromosoomi katkemises või mõlema kromatiidi katkemises ja taasühinemises samas kohas.

Endoreduplikatsioon – protsess, milles pärast DNA replikatsiooni S-perioodi tuum ei lähe mitoosi, vaid algab uus S-periood. Selle tulemusena tekivad kromosoomid, milles on 4, 8, 16, ... kromatiidi.

Tühik – akromaatiline kahjustus, mis on väiksem kui kromatiidi laius ja millel on kromatiidide orientatsiooni erinevus minimaalne.

Numbriline aberratsioon – kasutatud rakkude tüüpilisest normaalsest kromosoomiarvust erinev kromosoomide arv.

▼ B

Polüploidus – haploidse kromosoomiarvu (n) kordsus, v.a diploidne arv (nt 3n, 4n jne).

Struktuurne aberratsioon – kromosoomistruktuuri muutus, mida saab avastada raku jagunemise metafaasi etapi mikroskoopilisel uurimisel ja mida täheldatakse deletsiooni ja fragmentidena, kromosoomisest või -väliste muutustena.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Loomad allutatakse uuritava aine toimele, kasutades sobivat toimimisviisi, ja tapetakse sobiva aja möödudes töötlemisest. Enne tapmist töödeldakse loomi metafaasi peatava ainega (nt kolhitsiiniga või ainega Colcemid®). Seejärel tehakse luuüdirakkudest kromosoomipreparaadid ja need värvitakse ning metafaasi rakkude kromosoomaberratsioone analüüsitakse.

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1. Ettevalmistused

1.4.1.1. Loomaliikide valik

Tavaliselt kasutatakse rotte, hiiri ja hiina hamstreid, kuigi võib kasutada mis tahes sobivaid imetajate liike. Rakendatakse noorte tervete loomade tavaliselt kasutatavaid laboritüvesid. Uuringut alustades peaks loomade massi muutus olema minimaalne ja ei tohiks ületada $\pm 20\%$ iga soo keskmisest massist.

1.4.1.2. Pidamis- ja söötmingimused

Üldise sissejuhatus B osas toodud üldtingimusi kohaldatakse, kuigi otstarbekas niiskusesisaldus peaks olema 50–60 %.

1.4.1.3. Loomade ettevalmistamine

Terved noored täiskasvanud loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühma. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomad identifitseeritakse individuaalselt. Loomi harjutatakse laboritingimustega vähemalt viie päeva jooksul.

1.4.1.4. Annuste ettevalmistamine

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajaduse korral lahjendada enne loomadele andmist. Vedelaid uuritavaid aineid võib doseerida vahetult või lahjendada enne doseerimist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

1.4.2. Katsetingimused

1.4.2.1. Lahusti/kandjaaine

Lahusti/kandjaaine ei tohi avaldada toksilist mõju kasutatava annuse korral ega reageerida keemiliselt siooni uuritava ainega. Kui kasutatakse tuntud lahustist/kandjaainest erinevat, siis peab selle kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahusti/-kandjaaine kasutamist.

▼B1.4.2.2. *Kontrollkatsed*

Käesolevasse katsesse kaasatakse mõlema sugupoole korral paralleelsed positiivsed ja negatiivsed (lahusti/kandjaaine) kontrollkatsed. Kontrollrühma loomi käsitletakse nii nagu katserühma loomi, kuid neid ei töödelda uuritava ainega.

Positiivsed kontrollkatsed ei tohiks põhjustada struktuurseid aberratsioone *in vivo* kokkupuuetasemel, mis peaksid põhjustama avastatavat suurenemist fooniga võrreldes. Positiivsete kontrollainete annused valitakse sellised, et mõjud on selged, kuid neist ei ilmne riideris kohe kodeeritud objektiklaaside identsus. On aktsepteeritav, et positiivses kontrollkatses võib kasutada uuritava aine manustamisviisist erinevat viisi ja proovid võetakse üksnes korra. Samasse keemiliste ainete klassi kuuluvate positiivsete kontrollkemikaalide kasutamist võib kaaluda, kui selline aine on kättesaadav. Positiivsete kontrollainete näited:

Aine	CASi nr	EINECSi nr
Etüül-metaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
N-etüül-N-nitroso-karbamiid	759-73-9	212-072-2
Mitomütsiin-C	50-07-7	200-008-6
Tsüklofosfamiid	50-18-0	200-015-4
Tsiklofosfamiidmonohüdraat	6055-19-2	
Trietüleen-melamiin	51-18-3	200-083-5

Üksnes lahusti või kandjaainega töödeldud või muul katserühmaga samalaadsel viisil töödeldud negatiivsetest kontrollkatsetest võetakse proovid igal proovivõtukorral, välja arvatud siis, kui varasemad kontrollitulemused näitavad vastuvõetavat loomadevahelist varieerumist ja kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude esinemissagedust. Kui negatiivsetest kontrollkatsetest võetakse üksnes üks proov, on kõige sobivam võtta see esimesel proovivõtukorral. Lisaks sellele kasutatakse ka töötlemata kontrollproove, välja arvatud juhul, kui varasemad või avaldatud kontrollandmed näitavad, et valitud lahusti/kandjaaine ei indutseeri kahjulikke ega mutageenseid mõjusid.

1.5. MENETLUS

1.5.1. **Loomade arv ja sugu**

Nii katse- kui kontrollrühmas on mõlemast soost vähemalt viis analüüsitavaid looma. Kui uuringu ajal on kättesaadavad tulemused sama liigi sama vastuvõtlikkuse liini kasutades tehtud uuringute kohta, mille tulemused näitavad, et toksilisuses ei ole sugupoole vahel olulisi erinevusi, siis piisab vaid ühe sugupoolega katsete tegemisest. Kui inimese vastuvõtlikkus kemikaalidele on soospetsiifiline, nagu näiteks mõnede ravimite puhul, tehakse katse sobivast soost loomadega.

1.5.2. **Katse kava**

Uuritavad ained tuleb eelistatavalt manustada ühekordsete annustena. Uuritavaid aineid võib manustada ka jagatud annustena, näiteks kaks annust ühel päeval kuni mõnetunnise vahega, et hõlbustada suurte ainekoguste manustamist. Muud manustamisrežiimid peaksid olema teaduslikult tõestatud.

▼B

Proovid võetakse kahel korral samal päeval pärast manustamist. Näriliste puhul esimene proovivõtuaeg on 1,5 normaalset rakutsükli (rakutsükkel kestab tavaliselt 12–18 tundi) pärast manustamist. Kuna aeg uuritava aine sissevõtmise ja metabolismi vahel ja selle mõju rakutsükli kineetikale saavad mõjutada kromosoomaberratsiooni avastamise optimaalset aega, on soovitatav 24 tundi pärast esimese proovi võtmist koguda hilisem proov. Kui uuritavat ainet antakse kauem kui üks päev, tuleks võtta üks proov pärast viimast manustamist ajal, mis vastab 1,5 normaalse rakutsükli kestusele.

Enne tapmist süstitakse loomade kõhukelmesse sobiv annus metafaasi peatavat ainet (nt ainet Colcemid® või kolhitsiini). Loomadelt võetakse seejärel proovid sobiva intervalli järel. Hiirte puhul on see intervall ligikaudu 3–5 tundi; hiina hamstrite korral ligikaudu 4–5 tundi. Rakud kogutakse luuüdist ja neid analüüsitakse kromosoomaberratsioonide tuvastamiseks.

1.5.3. Annused

Kui sobivate andmete puudumisel tehakse annuse vahemiku määramiseks uuring, siis tehakse uuring samas laboris, kasutades samu liike, tüvesid, sugu ja manustamiskava kui põhiuuringus (5). Kui esineb mürgisus, kasutatakse esimeses proovivõtus kolme erinevat annust. Need annused peaksid hõlmama vahemikku suurimast kuni väiksema mürgisuseni või mürgisuse puudumiseni. Hilisemal proovivõtuajal on vaja kasutada üksnes suurimat annust. Suurim annus on määratletud annusena, mis põhjustab selliseid mürgistusnähte, et samale manustamisrežiimile põhinevate suuremate annustasemetega kasutamine võib põhjustada surma. Ained, millel on spetsiifilised bioloogilised mõjud väikeste mittetoksiliste annustena (nt hormoonid ja mitogeenid), võivad olla erandiks annuse määramise kriteeriumidele ja neid tuleks hinnata iga üksikjuhtumi puhul eraldi. Suurimat annust võidakse samuti määratleda annusena, mis põhjustab mõningaid mürgisusele viitavaid muutusi luuüdis (nt mitootiline indeks väheneb üle 50 %).

1.5.4. Piirkatse

Kui katse ühe annusega, milleks on vähemalt 2 000 mg/kg kehamassi kohta ja mida manustatakse ühekordse annusena või kahe annusena samal päeval, ei põhjusta täheldatavaid toksilisi mõjusid ja kui genotoksilisus ootuspäraselt põhineb struktuurselt lähedaste ainete andmetel, siis ei peeta kolme annuse taset käsitlevat täielikku uuringut vajalikuks. Kauem kestvate uuringute korral on piirannus 2 000 mg/kg kehamassi kohta päevas kuni 14 päeva kestval manustamisel ja 1 000 mg/kg kehamassi kohta päevas, kui manustamine kestab kauem kui 14 päeva. Inimeste ootuspärane vastuvõtlikkus võib viidata piirkatses kasutatavatest annustest suuremate annuste kasutamise vajadusele.

1.5.5. Manustamine

Uuritavat ainet manustatakse tavaliselt söögitoru kaudu või sobiva intubeerimiskanüüli abil või süstides kõhuõnde. Samuti võib muid manustamisviise aktsepteerida, kui need on põhjendatud. Vedeliku suurim maht, mida saab söögitoru kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Maht ei tohiks ületada 2 ml/100 g kehamassi kohta. Suuremate mahtude kasutamine peab olema põhjendatud. Kui välja arvata ärritavad või söövitavad ained, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katses kasutatavate mahtude varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks.

▼B**1.5.6. Kromosoomipreparaat**

Vahetult pärast tapmist kogutakse luuüdi, seda töödeldakse hüpotoonilise lahusega ja fikseeritakse. Seejärel kantakse rakud objektiklaasidele ja värvitakse.

1.5.7. Analüüs

Mitootiline indeks tuleks määrata tsütotoksilisuse määrana vähemalt 1 000 rakust looma kohta kõikides katseloomades (sh positiivsed kontrollid) ja töötlemata negatiivsetes kontrollloomades.

Vähemalt 100 raku tuleks iga looma puhul analüüsida. Seda arvu saab vähendada, kui täheldatakse palju aberratsioone. Kõik objektiklaasid, sh positiivsete ja negatiivsete kontrollkatsete omad, kodeeritakse sõltumatult enne mikroskoopilist analüüsi. Kui objektiklaasi valmistamise menetlused viivad tihti metafaasis olevate rakkude suhte rikkumiseni ja kromosoomide kaotamiseni, peaksid seega loendatud rakud sisaldama tsentromeere koguses, mis vastab modaalarvule $2n \pm 2$.

2. ANDMED**2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Andmed üksikute loomade kohta esitatakse tabeli kujul. Katseühikuks on loom. Iga looma puhul tuleks hinnata loendatud rakkude arvu, aberratsioonide arvu raku kohta ja struktuurse(te) kromosoomaberratsiooni(de)ga rakkude protsendimäära. Eri tüüpi struktuursed kromosoomaberratsioonid tuleks loetleda koos nende arvukuse ja esinemissagedustega katse- ja kontrollkultuurides. Tühikud (*gaps*) registreeritakse eraldi ja nende kohta antakse teavet, aga üldiselt ei võeta neid aberratsioonide üldsageduse hulka. Kui pole tõestust toime erinevuse kohta sugude vahel, võidakse kombineerida mõlema sugupoole andmed statistiliseks analüüsiks.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÖLGENDAMINE

Positiivse tulemuse saamiseks on mitmeid kriteeriume, nt kromosoomaberratsioonide sisaldavate rakkude suhtelise arvu suurenemine annusest tingituna või kromosoomaberratsioonide sisaldavate rakkude arvu selge suurenemine ühes annuse rühmas ühel proovivõtuajal. Tulemuste bioloogilist tähtsust tuleks esmalt arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel (6). Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse jaoks. Ebaselgeid tulemusi tuleks selgitada täiendaval uurimisel muudetud katsetingimustes.

Polüploidisuse suurenemine võib viidata sellele, et uuritav aine võib esile kutsuda numbrilisi aberratsioone. Endoreduplikatsiooni suurenemine võib viidata sellele, et uuritaval ainel on võime inhibeerida rakutsükli kulgemist (7, 8).

Uuritavat ainet, mille korral saadud tulemused ei vasta eespool toodud kriteeriumidele, peetakse käesolevas katses mittemutageeniks aineks.

▼B

Kuigi enamikus katsetes saadakse selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad harvadel juhtudel saadud tulemused uuritava aine aktiivsuse kohta kindlate otsuste tegemise. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud katsete arvust sõltumata.

In vivo kromosoomaberratsioonkatsel saadud positiivsed tulemused viitavad sellele, et aine põhjustab kromosoomaberratsioone testitud liikide luuüdis. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et antud katsetingimustes ei põhjusta aine kromosoomaberratsioone testitud liikide luuüdis.

Tõenäosust, et uuritav aine või selle metaboliidid jõuavad üldisesse vereringesse või eriti sihtkoesse (nt süsteemne toksilisus), tuleks arutada.

3. ARUANDLUS

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Kandjaaine:

- kandjaaine valiku põhjendamine;
- uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui see on teada.

Katseloomad:

- kasutatud liigid/tüved;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, toitumine jne;
- loomade individuaalne mass katse alustamisel, sh kehamassi vahemik, keskväärtused ja standardhälve iga rühma kohta.

Katsetingimused:

- positiivsed ja negatiivsed (kandjaaine/lahusti) kontrollkatsed;
- annuse vahemiku määramise uuringu andmed, kui see on tehtud;
- manustamise tasemete valimise põhimõtted;
- uuritava aine ettevalmistamise üksikasjad;
- uuritava aine manustamise üksikasjad;
- manustamistee põhjendus;
- meetodid, mis verifitseerivad, et uuritav aine jõuab üldisesse vereringesse või sihtkoesse, vajaduse korral;
- toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) teisendamine tegelikuks annuseks (mg/kg kehamassi kohta päevas), vajaduse korral;
- üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta;
- manustamis- ja proovivõtukavade üksikasjalik kirjeldus;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;

▼B

- metafaasi peatav aine, selle kontsentratsioon ja töötlemise kestus;
- objektiklaaside ettevalmistamise meetodid;
- aberratsioonide loendamise kriteeriumid;
- analüüsitud rakkude arv looma kohta;
- kriteeriumid, mille alusel uurimusi liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks.

Tulemused:

- toksilisuse tunnused;
- mitootiline indeks;
- aberratsioonide tüüp ja arv, antud iga looma kohta eraldi;
- aberratsioonide üldarv rühma kohta ning keskväärtused ja standardhälbed;
- aberratsioonide sisaldavate rakkude arv rühma kohta ning keskväärtused ja standardhälbed;
- ploidsuse muutused, kui neid esineb;
- doosi ja toime vaheline sõltuvus, võimaluse korral;
- võimalikud statistilised analüüsid;
- paralleelsed negatiivsed kontrollandmed;
- varasemad negatiivsed kontrollandmed ning vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed;
- paralleelsed positiivsed kontrollandmed.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

- 1) Adler, I. D. (1984), Cytogenetic Tests in Mammals, in: *Mutagenicity Testing: a Practical Approach*, S. Venitt and J. M. Parry (eds), IRL Press, Oxford, Washington D. C, pp. 275–306.
- 2) Preston, R. J., Dean, B. J., Galloway, S., Holden, H., McFee, A. F. and Shelby, M. (1987), Mammalian In Vivo Cytogenetic Assays: Analysis of Chromosome Aberrations in Bone Marrow Cells, *Mutation Res.*, 189, pp. 157–165.
- 3) Richold, M., Chandley, A., Ashby, J., Gatehouse, D. G., Bootman, J. and 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, pp. 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., Sutou, S. and Vannier, B. (1994), Report from the Working Group on the in Vivo Mammalian Bone Marrow Chromosomal Aberration Test, *Mutation Res.*, 312, pp. 305–312.
- 5) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313–319.

▼B

- 6) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson, R., Richold, M., Pap-worth, D. G. and 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, pp. 184–232.
- 7) Locke-Huhle, C. (1983), Endoreduplication in Chinese hamster cells during alpha-radiation-induced G2 arrest, *Mutation Res.*, 119, pp. 403–413.
- 8) Huang, Y., Change, C. and Trosko, J. E. (1983), Aphidicolin-induced endoreduplication in Chinese hamster cells, *Cancer Res.*, 43, pp. 1362–1364.

▼B**B.12. MUTAGEENSUS – PISITUUMA KATSE IMETAJATE ERÜTROTSÜÜTIDES *IN VIVO*****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

Imetajate pisituuma katset *in vivo* kasutatakse uuritava aine põhjustatud kromosoomikahjustuse või mitoosiaparaadi kahjustuse avastamiseks erütroblastides, analüüsides loomade, tavaliselt näriliste luuüdist ja/või perifeersetest vererakkudest võetud erütrotsüüte.

Pisituuma katse eesmärk on identifitseerida ained, mis põhjustavad tsütogeenset kahjustust, mille tulemuseks on kromosoomilõike fragmente või terveid kromosoomse sisaldava pisituuma moodustamine.

Kui luuüdi erütroblast areneb polükromaatseks erütrotsüüdiks, siis põhituum lükatakse välja; mis tahes moodustatud pisituum võib jääda muul viisil tuumata tsütoplasmasse. Põhituuma puudumine hõlbustab pisituumade avastamist neis rakkudes. Pisituumsete polükromaatsete erütrotsüütide sageduse suurenemine katseloomade puhul on indutseeritud kromosoomikahjustuse indikaatoriks.

Tavaliselt kasutatakse näriliste luuüdi käesolevas katses kuni polükromaatsete erütrotsüütide moodustumiseni kõnealusel koes. Ebaküpsete mikrotoomsete (polükromaatsete) erütrotsüütide mõõtmine perifeerses veres on võrdselt vastuvõetav mis tahes liigi puhul, mille põrn ei suuda hävitada pisituumseid erütrotsüüte või mis on piisavalt tundlikud selleks, et avastada struktuurseid või numbrilisi kromosoomaberratsioone põhjustavaid aineid. Pisituuma saab eristada erinevate kriteeriumide alusel. Nende hulka kuulub kinetohoori või tsentromeerse DNA olemasolu või puudumise tõendamine pisituumas. Ebaküpsete (polükromaatsete) pisituumsete erütrotsüütide esinemissagedus on peamine lõpp-punkt. Küpsete (normokromaatsete) erütrotsüütide arvu perifeerses veres, mis sisaldab pisituuma kypsete erütrotsüütide hulgas, saab samuti kasutada katse lõpp-punktina, kui loomadele manustatakse uuritavat ainet nelja või enama nädala jooksul.

Käesolev imetajate *in vivo* pisituuma katse on eriti vajalik mutageensuse ohu hindamiseks, kuna selles võidakse arvesse võtta *in vivo* metabolismi, farmakokineetika ja DNA parandusprotsesside tegureid, kuigi need võivad liigiti, kudede vahel ja geneetiliste lõpp-punktide osas erineda. *In vivo* katset võidakse samuti kasutada *in vitro* katses avastatud mutageense mõju täiendaval uurimisel.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav aine või reaktsioonivõimeline metaboliit ei pääse sihtkoesse, ei ole sobiv kasutada käesolevat katset.

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

▼B

1.2. MÕISTED

Tsentromeer (kinetohoor) – kromosoomi ala(d), kus kääviniidid kinnituvad raku jagunemise ajal, võimaldades tütarchromosoomide korrapäraselt liikumist tütarakkude poolustele.

Pisituum – väike tuum, mis on rakkude põhituumast eraldi ja sellega paralleelselt esinev, see on moodustunud mitoosi telofaasi (meioosi) ajal kromosoomilõike fragmentidest või tervetest kromosoomidest.

Normokromaatne erütrotsüüt – küps erütrotsüüt, millel puuduvad ribosoomid ja mida saab eristada mitteküpsetest, polükromaatsetest erütrotsüütidest ribosoomide jaoks valikuliste värvainete abil.

Polükromaatne erütrotsüüt – ebaküps erütrotsüüt, arengu vahefaasis olev erütrotsüüt, millel on endiselt alles ribosoomid ja seetõttu saab seda eristada kypsetest, normokromaatsetest erütrotsüütidest ribosoomide jaoks valikuliste värvainete abil.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Loomadele manustatakse uuritavat ainet sobiva manustamistee kaudu. Kui kasutatakse luuüdi, tapetakse loomad pärast manustamist sobival ajal, luuüdi eemaldatakse ning valmistatakse preparaadid ja need värvitakse (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7). Kui kasutatakse perifeerset verd, kogutakse veri sobival ajal pärast manustamist ning ägepreparaadid valmistatakse ja värvitakse (4, 8, 9, 10). Perifeerse vere uurimisel peaks jääma võimalikult vähe aega viimase manustamise ja rakkude kogumise vahele. Preparaate analüüsitakse pisituuma avastamiseks.

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1. Ettevalmistused

1.4.1.1. Loomaliikide valik

Kui kasutatakse luuüdi, siis on soovitatav kasutada hiiri või rotte, kuigi võib kasutada mis tahes imetajate liike. Perifeerse vere kasutamise korral soovitatakse hiiri. Siiski võib kasutada mis tahes imetajate liike, kelle põrn ei eemalda pisituumseid erütrotsüüte, või liike, kes on näidanud piisavat tundlikkust struktuursete või numbriliste kromosoomaberratsioonide tekitajate avastamiseks. Kasutatakse noorte tervete loomade tavaliselt kasutatavaid laboritüvesid. Uuringut alustades peaks loomade massi muutus olema minimaalne ega tohiks ületada $\pm 20\%$ iga soo keskmisest kaalust.

1.4.1.2. Pidamis- ja söötmingimused

Üldise sissejuhatus B osas toodud üldtingimusi kohaldatakse, kuigi otstarbekas niiskusesisaldus peaks olema 50–60 %.

▼B1.4.1.3. *Loomade ettevalmistamine*

Terved noored täiskasvanud loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühma. Loomad identifitseeritakse individuaalselt. Loomi harjutatakse laboritingimustega vähemalt viie päeva jooksul. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed.

1.4.1.4. *Annuste ettevalmistamine*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajaduse korral lahjendada enne loomadele andmist. Vedelaid uuritavaid aineid võib doseerida vahetult või lahjendada enne doseerimist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

1.4.2. **Katsetingimused**1.4.2.1. *Lahusti/kandjaaine*

Lahusti/kandjaaine ei tohi avaldada toksilist mõju kasutatavate annuste korral ega reageerida keemiliselt uuritava ainega. Kui kasutatakse tuntud lahustist/kandjaainest erinevat, peab selle kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele võrdlusandmetele. Soovitav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahusti/-kandjaaine kasutamist.

1.4.2.2. *Kontrollkatsed*

Käesolevasse katsesse kaasatakse mõlema sugupoole korral paralleelsed positiivsed ja negatiivsed (lahusti/kandjaaine) kontrollkatsed. Kontrollrühma loomi käsitletakse nii nagu katserühma loomi, kuid neid ei töödelda uuritava ainega.

Positiivsed kontrollkatsed peaksid tekitama pisituuma *in vivo* toime tasemel, millelt oodatakse fooniga võrreldes märgatava suurenemise põhjustamist. Positiivsete kontrollainete annused valitakse sellised, et mõjud on selged, kuid neist ei ilmne riideris kohe kodeeritud objektiivsuse identsus. On aktsepteeritav, et positiivses kontrollkatses võib kasutada uuritava aine manustamisviisist erinevat viisi ja proovid võetakse üksnes korra. Lisaks võib kaalutleda samasse keemiliste ainete klassi kuuluvate positiivsete kontrollkemikaalide kasutamist, kui sellised ained on kättesaadavad. Positiivsete kontrollainete näited:

Aine	CASi nr	EINECSI nr
Etüül-metaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
N-etiül-N-nitrosokarbamiid	759-73-9	212-072-2
Mitomütsiin-C	50-07-7	200-008-6
Tsüklofosfamiid	50-18-0	200-015-4
Tsüklofosfamiidmonohüdraat	6055-19-2	
Trietüleen-melamiin	51-18-3	200-083-5

▼B

Üksnes lahustit või kandjaainet saanud või muul katserühmaga samaaadsel viisil töödeldud negatiivsetest kontrollkatsetest võetakse proovid igal proovivõtukorral, välja arvatud siis, kui varasemad kontrollitulemused näitavad vastuvõetavat loomadevahelist varieerumist ja kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude esinemissagedust. Kui negatiivsetest kontrollkatsetest võetakse üksnes üks proov, on kõige sobivam võtta see esimesel proovivõtukorral. Lisaks sellele kasutatakse ka töötlemata kontrollproove, välja arvatud juhul, kui varasemad või avaldatud kontrollandmed näitavad, et valitud lahusti/kandjaaine ei indutseeri kahjulikke ega mutageenseid mõjusid.

Kui kasutatakse perifeerset verd, võib enne töötlemist võetud proov olla samuti aktsepteeritav paralleelse negatiivse kontrollina, kuid üksnes perifeerse verega tehtud lühiajalistel katsetel (nt 1–3 töötlemist), kui saadud tulemused on varasemate kontrollide alusel oodatavas vahemikus.

1.5. MENETLUS

1.5.1. Loomade arv ja sugu

Nii katse- kui kontrollrühmas on mõlemast soost vähemalt viis analüüsitavaid looma (11). Kui uuringu ajal on kättesaadavad tulemused sama liigi korral sama manustamisteed kasutades tehtud uuringute kohta, mille tulemused näitavad, et toksilisuse osas ei ole olulisi erinevusi sugupoolte vahel, siis piisab katsete tegemisest vaid ühe sugupoolega. Kui inimese vastuvõtlikkus kemikaalidele on soospetsiifiline, nagu näiteks mõnede ravimite puhul, tehakse katse sobivast soost loomadega.

1.5.2. Manustamiskava

Ei ole võimalik soovitada ühtegi standardset manustamiskava (nt üks, kaks või enam manustamist 24tunniste intervallidega). Pikemate manustamisrežiimide ajal kogutud proovid on aktsepteeritavad, kui positiivset mõju on näidatud käesolevas katses või negatiivses katses on näidatud toksilisust või on kasutatud piirannust ja manustamist on jätkatud proovivõtmise ajani. Uuritavaid aineid võib manustada ka jagatud annustena, näiteks kaks annust ühel päeval kuni mõnetunnise vahega, et hõlbustada suurte ainemahtude andmist.

Katset võib sooritada kahel viisil:

- a) loomadele manustatakse uuritavat ainet ühel korral. Proove luuakse võetakse vähemalt kahel korral, alustades mitte varem kui 24 tundi pärast manustamist, kuid mitte hiljem kui 48 tundi pärast manustamist, ning proovide võtmise vahel on sobiv intervall. Proovide võtmine varem kui 24 tundi pärast manustamist peaks olema põhjendatud. Perifeerse vere proovid võetakse vähemalt kahel korral, alustades mitte varem kui 36 tundi pärast manustamist, ning esimesele proovile järgneb sobiv intervall, kuid mitte hiljem kui 72 tundi pärast manustamist. Kui positiivne tulemus on tuvastatav ühel proovivõtukorra järel, siis lisaproovide võtmist ei ole vaja;

▼B

- b) kui kasutatakse kahte või enamat päevaannust (nt kaks või rohkem manustamist 24tunniste intervallidega), kogutakse proovid üks kord 18–24 tundi pärast viimast manustamist luuüdisse ja korra 36–48 tundi pärast viimast manustamist perifeersesse verre (12).

Vajaduse korral võib lisaproove võtta muul ajal.

1.5.3. **Annused**

Kui tehakse annuse vahemiku määramiseks uuring sobivate andmete puudumisel, siis tehakse uuring samas laboris, kasutades samu liike, tüvesid, sugu ja manustamisrežiimi, mida kasutatakse põhiuuringus (13). Kui esineb mürgisus, kasutatakse kolme erinevat annust esimese proovivõtu jaoks. Need annused peaksid hõlmama vahemikku suurimast kuni väiksema mürgisuseni või mürgisuse puudumiseni. Hilisemal proovivõtuajal on vaja kasutada üksnes suurimat annust. Suurim annus on määratletud annusena, mis põhjustab selliseid mürgistusnähte, et samale manustamisrežiimile põhinevate suuremate annuste kasutamine võib põhjustada surma. Ained, millel on spetsiifilised bioloogilised mõjud väikeste mittetoksiliste annusena (nt hormoonid ja mitogeenid), võivad olla erandiks annuse määramise kriteeriumidele ja neid tuleks hinnata iga üksikjuhtumi puhul eraldi. Suurimat annust võidakse samuti määratleda annusena, mis põhjustab mõningaid mürgisusele viitavaid muutusi luuüdis (nt ebaküpsete erütrotsüütide hulga vähenemine erütrotsüütide koguarvus luuüdis või perifeerses veres).

1.5.4. **Piirkatse**

Kui katse ühe annusega, milleks on vähemalt 2 000 mg/kehamassi kg kohta ja mida manustatakse ühekordse annusena või kahe annusena samal päeval, ei põhjusta täheldatavaid toksilisi mõjusid ja kui genotoksilisus ootuspäraselt põhineb struktuurselt lähedaste ainete andmetel, siis ei peeta kolme annuse taset käsitlevat täielikku uuringut vajalikuks. Kauem kestvate uuringute korral on piirannus 2 000 mg/kehamassi kg kohta päevas kuni 14 päeva kestval manustamisel ja 1 000 mg/kehamassi kg kohta päevas, kui manustamine kestab kauem kui 14 päeva. Inimeste ootuspärane vastuvõtlikkus võib viidata piirkatses kasutatavatest annustest suuremate annuste kasutamise vajadusele.

1.5.5. **Manustamine**

Uuritavat ainet manustatakse tavaliselt söögitoru kaudu või sobiva intubeerimiskanüüli abil või süstides kõhuõnde. Samuti võib muid manustamisviise aktsepteerida, kui need on põhjendatud. Vedeliku suurim maht, mida saab söögitoru kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Maht ei tohiks ületada 2 ml/100 g kehamassi kohta. Suuremate mahtude kasutamine peab olema põhjendatud. Kui välja arvata ärritavad või söövitavad ained, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katses kasutatavate mahtude varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks.

▼B**1.5.6. Luuüdi-/verepreparaat**

Luuüdirakud saadakse tavaliselt reieluudest või sääreluudest vahetult pärast tapmist. Rakud eemaldatakse reieluudest või sääreluudest, neist tehakse preparaadid ja värvitakse kindlaks kujunenud meetoditel. Perifeerne veri võetakse sabaveenist või muust sobivast vere-soonest. Vererakud värvitakse kohe supravitaalvärvide abil (8, 9, 10) või tehakse äigepreparaadid ja seejärel värvitakse. DNA-spetsiifilise värvaine kasutamine (nt akridiinoranž (14) või Hoechst 33258 + püroiniin-Y (15)) võib kõrvaldada mõned mitte-DNA-spetsiifiliste värvainete kasutamisega seotud artefaktid. See eelis ei välista tavaliste värvainete (nt Giemsa) kasutamist. Täiendavaid süsteeme (nt tsellulooskolonne tuumsete rakkude eemaldamiseks (16)) saab samuti kasutada, kui kõnealused süsteemid on piisavalt toimivad laboris pisituumapreparaatide valmistamiseks.

1.5.7. Analüüs

Ebaküsete erütrotsüütide osa kõikide (ebaküsete + küpsete) erütrotsüütide hulgas määratakse iga looma puhul eraldi, loendades kokku vähemalt 200 erütrotsüüti luuüdist ja 1 000 erütrotsüüti perifeerses verest (17). Kõik objektiklaasid, sh positiivsete ja negatiivsete kontrollkatsete omad, kodeeritakse sõltumatult enne mikroskoopilist analüüsi. Ebaküsete pisituumsete erütrotsüütide esinemissageduse määramiseks loendatakse looma kohta vähemalt 2 000 ebaküset erütrotsüüti. Lisateavet võidakse saada, loendades pisituumasid küpsetes erütrotsüütides. Objektiklaase analüüsides ei tohiks ebaküsete erütrotsüütide osa kõikide erütrotsüütide hulgas olla väiksem kui 20 % kontrollväärtusest. Kui loomadele manustatakse uuritavat ainet pidevalt nelja või enama nädala jooksul, saab loendada vähemalt 2 000 küpset erütrotsüüti looma kohta pisituumade esinemissageduse määramiseks. Automaatsed analüüsisüsteemid (kujutise analüüs ja rakususpensioonide voolutsütomeetria) on vastuvõetavad alternatiivid manuaalsele hindamisele, kui see on asjakohaselt põhjendatud ja valideeritud.

2. ANDMED**2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Andmed üksikute loomade kohta esitatakse tabeli kujul. Katseühikuks on loom. Ebaküsete erütrotsüütide arv, pisituumsete ebaküsete erütrotsüütide arv ja ebaküsete erütrotsüütide osa kõikidest erütrotsüütidest tuleks iga analüüsitava looma kohta loetleda eraldi. Kui loomadele manustatakse uuritavat ainet pidevalt nelja või enama nädala jooksul, tuleks samuti esitada teave küpsete erütrotsüütide kohta, kui seda on kogutud. Ebaküsete erütrotsüütide osa kõikidest erütrotsüütidest ja, vajaduse korral, pisituumsete erütrotsüütide protsendimäär esitatakse iga looma kohta. Kui pole tõestust vastuse sugudevahelise erinevuse kohta, võidakse kombineerida mõlema sugupoole andmed statistiliseks analüüsiks.

▼B

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Positiivse tulemuse saamiseks on mitmeid kriteeriume, nt pisituumsete rakkude arvu suurenemine annusest tingituna või pisituumsete rakkude arvu selge suurenemine ühes annuse rühmas ühel proovivõtuajal. Tulemuste bioloogilist tähtsust tuleks esmalt arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel (18, 19). Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse jaoks. Ebaselgeid tulemusi tuleks selgitada täiendaval uurimisel meelepäraselt muudetud katsetingimustes.

Uuritavat ainet, mille korral saadud tulemused ei vasta eespool toodud kriteeriumidele, peetakse käesolevas katses mittemutageenseks aineks.

Kuigi enamikus katsetes saadakse selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad harvadel juhtudel saadud tulemused uuritava aine aktiivsuse kohta kindlate otsuste tegemise. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud katsete kordamisest sõltumata.

Pisituuma katse positiivsed tulemused viitavad sellele, et aine indutseerib pisituumi, mis põhjustavad kromosoomikahjustuse või mitoosiaparaadi kahjustuse katseliikide erütroblastides. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et antud katsetingimustes ei tekita aine katseliikide ebaküpsetes erütrotsüütides pisituumi.

Tõenäosust, et uuritav aine või selle metaboliidid jõuavad üldisesse vereringesse või eriti sihtkoosse (nt süsteemne toksilisus), tuleks arutada.

3. ARUANDLUS

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Lahusti/kandjaaine:

- kandjaaine valiku põhjendamine;
- uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui see on teada.

Katseloomad:

- kasutatud liigid/tüved;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, toitumine jne;
- loomade individuaalne mass katse alustamisel, sh kehamassi vahemik, keskväärtus ja standardhälve iga rühma kohta.

Katsetingimused:

- positiivseid ja negatiivseid (lahus/kandjaaine) kontrollkatseid käsitlevad andmed;
- annuse vahemiku määramise uuringu tulemused, kui see on tehtud;

▼ B

- annuste valimiku põhimõtted;
- uuritava aine ettevalmistamise üksikasjad;
- uuritava aine manustamise üksikasjad;
- manustamistee põhjendus;
- meetodid, mis verifitseerivad, et uuritav aine jõuab üldisesse vereringesse või sihtkoesse, vajaduse korral;
- toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) teisendamine tegelikuks annuseks (mg/kehamassi kg kohta päevas), vajaduse korral;
- üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta;
- manustamis- ja proovivõtukavade üksikasjalik kirjeldus;
- objektiklaaside ettevalmistamise meetodid;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- ebaküpsete pisituumsete erütrotsüütide loendamise kriteeriumid;
- analüüsitud rakkude arv looma kohta;
- kriteeriumid, mille alusel uurimusi liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks.

Tulemused:

- toksilisuse tunnused;
- ebaküpsete erütrotsüütide osa kõikides erütrotsüütides;
- ebaküpsete pisituumsete erütrotsüütide arv, esitatakse iga looma kohta eraldi;
- ebaküpsete erütrotsüütide keskväärts \pm standardhälve rühma kohta;
- doosi ja toime vaheline sõltuvus, võimaluse korral;
- kasutatud statistilised analüüsid ja meetodid;
- paralleelsed ja varasemad negatiivsed kontrollandmed;
- paralleelsed positiivsed kontrollandmed.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4.

VIITED

- 1) Heddle, J. A. (1973), A Rapid In Vivo Test for Chromosomal Damage, *Mutation Res.*, 18, pp. 187–190.
- 2) Schmid, W. (1975), The Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 9–15.
- 3) Heddle, J. A., Salamone, M. F., Hite, M., Kirkhart, B., Mavournin, K., MacGregor, J. G. and Newell, G W. (1983), The Induction of Micronuclei as a Measure of Genotoxicity, *Mutation Res.* 123, pp. 61–118.
- 4) Mavournin, K. H., Blakey, D. H., Cimino, M. C., Salamone, M. F. and Heddle, J. A. (1990), The In Vivo Micronucleus Assay in Mammalian Bone Marrow and Peripheral Blood. A report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 239, pp. 29–80.

▼B

- 5) MacGregor, J. T., Schlegel, R., Choy, W. N. and Wehr, C. M. (1983), Micronuclei in Circulating Erythrocytes: A Rapid Screen for Chromosomal Damage During Routine Toxicity Testing in Mice, in: *Developments in Science and Practice of Toxicology*, ed. A. W. Hayes, R. C. Schnell and T. S. Miya. Elsevier, Amsterdam, pp. 555–558.
- 6) MacGregor, J. T., Heddle, J. A. Hite, M., Margolin, G. H., Ramel, C., Salamone, M. F., Tice, R. R., and Wild, D. (1987), Guidelines for the Conduct of Micronucleus Assays in Mammalian Bone Marrow Erythrocytes, *Mutation Res.*, 189, pp. 103–112.
- 7) MacGregor, J. T., Wehr, C. M., Henika, P. R. and 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, pp. 513–522.
- 8) Hayashi, M., Morita, T., Kodama, Y., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1990), The Micronucleus Assay with Mouse Peripheral Blood Reticulocytes Using Acridine Orange-Coated Slides, *Mutation Res.*, 245, pp. 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, MMS, *Mutation Res.*, 278, pp. 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, pp. 153–159.
- 11) Hayashi, M., Tice, R. R., MacGregor, J. T., Anderson, D., Blackey, D. H., Kirsch-Volders, M., Oleson, Jr. F. B., Pacchicotti, F., Romagna, F., Shimada, H. Sutou, S. and Vannier, B. (1994), in Vivo Rodent Erythrocyte Micronucleus Assay, *Mutation Res.*, 312, pp. 293–304.
- 12) Higashikuni, N. and Sutou, S. (1995), An optimal, generalised sampling time of 30 ± 6 h after double dosing in the mouse peripheral micronucleus test, *Mutagenesis*, 10, pp. 313–319.
- 13) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Rochold, M. (1992), Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose Setting in In Vivo Mutagenicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 313–319.
- 14) Hayashi, M., Sofumi, T. and Ishidate, M. Jr. (1983), An Application of Acridine Orange Fluorescent Staining to the Micronucleus Test, *Mutation Res.*, 120, pp. 241–247.
- 15) 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 Pyromin Y, *Mutation Res.*, 120, pp. 269–275.
- 16) Romagna, F. and Staniforth, C. D. (1989), The automated bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 213, pp. 91–104.
- 17) Gollapudi, B. and McFadden, L. G. (1995), Sample size for the estimation of polychromatic to non-mochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation Res.*, 347, pp. 97–99.

▼B

- 18) Richold, M., Ashby, J., Bootman, J., Chandley, A., Gatehouse, D. G. and Henderson, L. (1990), *In Vivo Cytogenetics Assay*, 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, pp. 115–141.
- 19) Lovell, D. P., Anderson, D., Albanese, R., Amphlett, G. E., Clare, G., Ferguson R., Richold, M., Pap-worth, D. G. and Savage, J. R. K. (1989), *Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays*, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data*. UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report, Part III, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184–232.

▼B**B.13/14. MUTAGEENSUS – BAKTERITE PÕÖRDMUTATSIOONKATSE****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 471, Bacterial Reverse Mutation Test (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

Bakterite pöördmutatsioonkatses kasutatakse aminohappeid vajavaid *Salmonella typhimurium*'i ja *Escherichia coli* tüvesid punktmutatsiooni avastamiseks, millega kaasneb ühe või mitme DNA aluspaari asendus, lisamine või deletsioon (1, 2, 3). Käesoleva bakterite pöördmutatsioonkatse põhimõtteks on avastada mutatsioonid, mis parandavad katsetüvedes olevaid mutatsioone ja taastavad bakterite funktsionaalse võime sünteesida põhilisi aminohappeid. Revertantsed bakterid avastatakse seepärast, et nad on võimelised kasvama, kuigi katsebakteritüves vajalik aminohape puudub.

Punktmutatsioonid põhjustavad inimestel mitmeid geneetilisi haigusi ja on märkimisväärseid tõendeid selle kohta, et punktmutatsioonid onkogeenides ja keharakkude kasvaja supressorgeenides osalevad inimeste ja katseloomade kasvajate moodustumisel. Bakterite pöördmutatsioonkatse on kiire, odav ja suhteliselt kergesti sooritatav. Paljudel katsetüvedel on mitmeid omadusi, mis muudavad nad tundlikumaks mutatsioonide avastamiseks, sh kergesti reageerivad DNA järjestused pöördmutatsiooni saitides, rakkude suurenenud läbitavus suurte molekulide suhtes ja DNA parandamise süsteemide kõrvaldamine või vigadele vastuvõtlike DNA parandamisprotsesside tõhustamine. Katsetüvede spetsiifilisus võib anda vajalikku teavet genotoksiliste ainete põhjustatud mutatsiooni tüüpide kohta. Väga ulatuslik andmebaas eri struktuuride korral saadud tulemuste kohta on kättesaadav bakterite pöördmutatsioonkatsete põhjal ja kindlaks kujunenud meetodid on välja töötatud erinevate füüsikalise-keemiliste omadustega keemiliste ainete, sh lenduvate ühendite testimiseks.

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

1.2. MÕISTED

Pöördmutatsioonkatse kas *Salmonella typhimurium*'i või *Escherichia coli* puhul avastab mutatsiooni aminohapet (vastavalt histidiinis või trüptofaanis) nõudvas tüves, mille tulemusena tekib väljastpoolt saadud aminohappest sõltumatu tüvi.

Aluspaari asendusmutageenid on ained, mis põhjustavad aluse vahetust DNAs. Pöördmutatsioonkatses võib kõnealune muutus aset leida algupärase mutatsiooni kohas või muus bakterigenoomi saidis.

Raaminihke mutageenid on ained, mis põhjustavad ühe või mitme DNA aluspaari lisamist või deletsiooni, seega muutes RNA lugemisraami.

▼B

1.3. ALGSED KAALUTLUSED

Bakterite pöördmutatsioonkatse kasutab prokariotseid rakke, mis erinevad imetajate rakkudest sellise tegurite poolest nagu tagasihaare, metabolism, kromosoomi struktuur ja DNA parandamisprotsessid. Tehtud *in vitro* katsed üldjuhul nõuavad eksogeenset metaboolset aktiveerimist. *In vitro* metaboolse aktiveerimise süsteem ei saa tervenisti jäljendada *in vivo* tingimusi imetajatel. Seetõttu ei anna katse otseselt teavet aine mutageensuse või kantserogeensuse kohta imetajatel.

Bakterite pöördmutatsioonkatset kasutatakse tavaliselt genotoksilisust ja eriti punktmutatsiooni põhjustava tegevuse algseks skriinimiseks. Ulatuslik andmebaas on näidanud, et mitmetel keemilistel ainetel, mis annavad käesolevas katses positiivseid tulemusi, on mutageenne aktiivsus ka muudes katsetes. On näiteid mutageensetest ainetest, mida ei avastata käesoleva katse abil; nende ebaõnnestumiste põhjusteks on avastatud lõpp-punkti spetsiifiline olemus, metaboolse aktiveerimise erinevused või biosaadavuse erinevused. Teisalt võivad tegurid, mis tõhustavad bakterite pöördmutatsioonikatse tundlikkust, viia mutageense aktiivsuse ülehindamiseni.

Bakterite pöördmutatsioonkatse ei sobi teatud klassidesse kuuluvate keemiliste ainete hindamiseks, nt väga bakteritsiidsed ühendid (nt teatud antibiootikumid) ja need, mida peetakse (või tuntakse) imetajate raku replikatsioonisüsteemi (nt mõnede topoisomeraasi inhibiitorite ja mõnede nukleosiidide analoogide) mõjutajatenä. Sellistel juhtudel on imetajate mutatsioonikatsed sobivamad.

Kuigi paljud ühendid, mis annavad positiivseid tulemusi käesolevas katses, on imetajate kantserogeendid, ei ole korrelatsioon täielik. See sõltub keemilisest aineklassist ning esineb kantserogeene, mida käesoleva katse abil ei avastata, kuna nad tegutsevad muude, mittegenotoksiliste mehhanismide või bakterirakkudes puuduvate mehhanismide abil.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Bakterirakkude suspensioonid allutatakse uuritava aine toimele eksogeense metaboolse aktiveerimise olemasolu ja puudumise korral. Vahetu kokkusegamise meetodil segatakse kõnealused suspensioonid külviagariga ja asetatakse vahetult minimaalsesse kasvukeskkonda. Preinkubatsioonimeetodi puhul inkubeeritakse uuritavat ainet sisaldav segu ja segatakse seejärel külviagariga enne minimaalsesse kasvukeskkonda asetamist. Mõlema meetodika puhul pärast kahte või kolme inkubatsioonipäeva loendatakse revertantkolooniad ja võrreldakse nende arvu spontaansete revertantkolooniatega arvuga lahusti kontrollplaatidel.

On kirjeldatud mitmeid bakterite pöördmutatsioonkatse sooritamise menetlusi. Nende seas on enimkasutatavad vahetu kokkusegamise meetodid (1, 2, 3, 4), preinkubatsioonimeetodid (2, 3, 5, 6, 7, 8), fluktuatsioonimeetodid (9, 10) ja suspensioonimeetodid (11). Gaaside või arude uurimist käsitlevaid muudatusi on kirjeldatud (12).

▼B

Kõnealusel meetodil kirjeldatud menetlused puudutavad peamiselt vahetu kokkusegamise ja preinkubatsioonimeetodit. Nende mõlema abil võidakse teha katseid koos metaboolse aktiveerimisega või ilma selleta. Mõned ained võivad olla paremini tuvastatavad preinkubatsioonimeetodi abil. Need ained kuuluvad keemilistesse aineklassidesse, kus on lühiahelalised alifaatsed nitrosoamiinid, metallid oksüdatsioonastmega + 2, aldehüüdid, asovärvid ja diasõhendid, pürolisidiinalkaloidid, allüülühendid ja nitroühendid (3). Samuti on tähelestatud, et teatud mutageenide klasse ei tuvastata alati standardmenetluste abil, nagu nt vahetu kokkusegamise meetodil või preinkubatsioonimeetodil. Neid tuleks vaadelda „erijuhtudena” ja on rangelt soovitatav, et nende tuvastamiseks kasutataks alternatiivseid menetlusi. Järgmised „erijuhtud” on võimalik ära tunda (koos menetluste näidetega, mida võib nende tuvastamiseks kasutada): asovärvained ja diasõhendid (3, 5, 6, 13), gaasid ja lenduvad kemikaalid (12, 14, 15, 16) ning glükosiidid (17, 18). Kõrvalekaldeid standardmenetlustest on vaja teaduslikult põhjendada.

1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.5.1. Ettevalmistused

1.5.1.1. *Bakterid*

Värsked bakterikultuurid tuleb kasvatada kuni hilise eksponentsiaalse või varase statsionaarse kasvufaasini (ligikaudu 10^9 raku ml kohta). Hilises statsionaarses faasis olevaid kultuure ei tohiks kasutada. On oluline, et katses kasutatavad kultuurid sisaldaksid elujõuliste rakkude suuri tiitreid. Tiitrit võib näidata kas varasematest kontrollkatsetest saadud kasvukõverate abil või määrates igas analüüsis elujõuliste rakkude arv külvikatsel.

Soovitatav inkubatsioonitemperatuur on 37 °C.

Tuleks kasutada vähemalt viit bakteritüve. Nende hulka peaks kuuluma neli tüve *S. typhimurium*’ilt (TA 1535; TA 1537 või TA97a või TA97; TA98; ja TA100), mida peetakse usaldusväärseteks ja mis on andnud reprodutseeritava vaste eri laborites. Nendes neljas *S. typhimurium*’i tüves on GC aluspaarid alguses pöördmutatsioonisaidis ja on teada, et need ei avasta teatud oksüdeerivaid mutageene, ristseoseid moodustavaid aineid ja hüdrasiine. Selliseid aineid võib avastada *E. coli* WP2-tüvede või *S. typhimurium* TA1 02 (19) abil, millel on AT aluspaar alguses pöördmutatsioonisaidis. Seetõttu on soovitatavad tüvede kombinatsioonid järgmised:

— *S. typhimurium* TA1535;

— *S. typhimurium* TA1537 või TA97 või TA97a;

— *S. typhimurium* TA98;

— *S. typhimurium* TA100;

— *E. coli* WP2 uvrA või *E. coli* WP2 uvrA (pKM101) või *S. typhimurium* TA102.

Ristseostuvate mutageenide avastamiseks on eelistatav kasutada TA1 02 või lisada DNA parandusele spetsiifilist *E. coli* tüve (nt *E. coli* WP2 või *E. coli* WP2 (pKM101)).

▼B

Tüvikultuuri preparaatide valmistamiseks, markeri verifitseerimiseks ja säilitamiseks tuleks kasutada väljakujunenud menetlusi. Kasvuks mõeldud aminohappe vajadust tuleks näidata iga külmutatud tüvikultuuri varupreparaadi puhul (*S. typhimurium*'i tüvede puhul histidiin ja *E. coli* tüvede puhul trüptofaan). Muid fenotüüpseid tunnuseid tuleks vastavalt kontrollida: R-faktori plasmiidide esinemist või puudumist, vajaduse korral (nt ampitsilliini resistentsus TA98, TA100 ja TA97a või TA97, WP2 uvrA ja WP2 uvrA (pKM101) tüvede puhul ning ampitsilliini + tetratsükliini resistentsus TA102 tüve puhul); iseloomulike mutatsioonide esinemine (nt tundlikkusest kristallvioleti suhtes põhjustatud rfa-mutatsioon *S. typhimurium*'is ja tundlikkusest ultraviolettkiirguse suhtes põhjustatud uvrA-mutatsioon *E. coli*'is või uvrB-mutatsioon *S. typhimurium*'is) (2, 3). Tüved peaksid samuti andma plaatidel spontaansete revertantsete bakterite kolooniate loendamise tulemusi, mis vastavad laborite esinemissageduste kontrollandmete vahemikele ja kirjanduses eelistatult esitatud vahemikele.

1.5.1.2. *Sööde*

Kasutatakse sobivat minimaalset agarit (sisaldab nt Vogel-Bonneri minimaalset söödet E ja glükoosi) ja külviagarit, mis sisaldab histidiini ja biotiini või trüptofaani, mis võimaldavad raku jagunemist (1, 2, 9).

1.5.1.3. *Metaboolne aktiveerimine*

Bakterid puutuvad kokku uuritava ainega nii vastava metaboolse aktiveerimissüsteemi olemasolu kui ka puudumise korral. Enim kasutatav süsteem on ensüüme indutseerivate ainete, nt Aroclor 1254ga (1, 2) või fenobarbitooni ja β -naftoflavooni seguga (18, 20, 21) töödeldud näriliste maksast valmistatud postmitokondriaalne osa (S9), millele on lisatud kofaktor. Tavaliselt kasutatakse postmitokondriaalset fraktsiooni kontsentratsiooni vahemikus 5–30 mahuprotsenti S9-segus. Metaboolse aktiveerimissüsteemi valik ja tingimused võivad sõltuda uuritava keemilise aine klassist. Mõnel juhul on vaja kasutada postmitokondriaalse fraktsiooni rohkem kui üht kontsentratsiooni. Asovärvainete ja diasõhendite puhul võib olla sobivam kasutada redutseerivat metaboolse aktiveerimise süsteemi (6, 13).

1.5.1.4. *Uuritav aine/ettevalmistused*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajaduse korral lahjendada enne bakterite töötlemist. Vedelad uuritavad ained võib lisada vahetult katse-süsteemidesse ja/või lahjendada enne manustamist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

Lahusti/kandjaaine ei tohiks uuritava ainega keemiliselt reageerida ning see peaks sobima rakkude eluvõimelisuse ja S9 aktiivsusega (22). Kui kasutatakse muud kui tuntud lahustit/kandjaainet, siis peab selle kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahusti/kandjaaine kasutamist. Vees ebapüsivate ainete uurimisel kasutatavad orgaanilised lahustid peavad olema veevabad.

▼B1.5.2. **Katsetingimused**1.5.2.1. *Katsetüved (vt 1.5.1.1)*1.5.2.2. *Manustamise kontsentratsioon*

Kasutatavate katseainete suurima koguse määramisel võetakse arvesse tsütotoksilisust ja lahustuvust lõplikus katsesegus.

Tsütotoksilisust ja lahustuvust võib olla kasulik määrata eelkatses. Tsütotoksilisust võib tuvastada töödeldud kultuurides revertantsete kolooniate arvu vähenemise, lausfooni selginemise või vähenemise või rakkude ellujäämisastme abil. Aine tsütotoksilisust võib muuta metaboolsete aktiveerimissüsteemide esinemise korral. Lahustumatust tuleks hinnata lõplikus segus palja silmaga nähtava sadestuse tekke põhjal tegelikes katsetingimustes.

Soovitav suurim katsekonsentratsioon lahustuvate mittetoksiliste ainete kohta on 5 mg plaat või 5 µl plaat. Mittetoksiliste ainete puhul, mis on lahustumatud kontsentratsioonidel 5 mg plaadi kohta või 5 µl plaadi kohta, peaks üks või enam uuritavat kontsentratsiooni vastama lahustumatusele lõplikus katsesegus. Katseaineid, mis on tsütotoksilised juba kontsentratsioonidel alla 5 mg plaadi kohta või 5 µl plaadi kohta, tuleks testida tsütotoksilise kontsentratsiooni suhtes. Sadestus ei tohiks mõjutada tulemust.

Tuleks kasutada vähemalt viit erinevat analüüsitava katseaine kontsentratsiooni, mille korral on katsepunktidele vastav vahemik ligikaudu poollogaritmiline (nt $\sqrt{10}$). Kontsentratsiooniõltuvuse uurimisel võivad olla sobivamad väiksemad intervallid. Hinnates aineid, mis sisaldavad märkimisväärsel hulgal võimalikke mutageenseid lisandeid, võib kõne alla tulla katsete tegemine suuremate kontsentratsioonidega kui 5 mg plaadi kohta või 5 µl plaadi kohta.

1.5.2.3. *Negatiivsed ja positiivsed kontrollkatsed*

Igas katses kasutatakse paralleelseid positiivseid ja negatiivseid (lahusti või kandjaaine) kontrollkatseid nii metaboolse aktiveerimisega kui ka ilma selleta. Positiivsetes kontrollkatsetes kasutatavad kontsentratsioonid tuleb valida selliselt, et need näitaksid iga katse sooritamise tõhusust.

Metaboolset aktiveerimissüsteemi kasutatavate katsete puhul tuleks välja valida positiivsete kontrollkatsete võrdlusaine(d) kasutatavate bakteritüvede tüübi põhjal.

Järgmised ained on näited sobivatest positiivsetest kontrollainetest metaboolse aktiveerimisega katsete jaoks:

Aine	CASi nr	EINECSi nr
781-43-1	212-308-4	9,10-dimetüülantratseen
57-97-6	200-359-5	7,12-dimetüülbens(α)antratseen
50-32-8	200-028-5	Benso(a)pireen
613-13-8	210-330-9	2-aminoantratseen

▼B

Aine	CASi nr	EINECSi nr
50-18-0		Tsüklofosfamiid
6055-19-2	200-015-4	Tsüklofosfamiidmonohüdraat

Järgmine aine on sobiv positiivseks kontrolliks redutseeriva metaboolse aktiveerimise meetodi jaoks:

Aine	CASi nr	EINECSi nr
Kongopunane	573-58-0	209-358-4

2-aminoantratseeni ei tohiks kasutada S9-segu tõhususe ainsa indikaatorina. Kui kasutatakse 2-aminoantratseeni, peaks iga S9-partiid samuti iseloomustama mutageeniga (nt benso[a]püreen, dimetüülbensoantratseen), mis eeldab mikrosomaalse ensüümi tekitatud metaboolset aktiveerimist.

Järgmised ained on näited positiivsetest tüvele spetsiifilistest sobivatest kontrollainetest eksogeense metaboolse aktiveerimissüsteemiga katsete jaoks:

Aine	CASi nr	EINECSi nr	Tüvi
Naatriumasiid	26628-22-8	247-852-1	TA 1535 ja TA 100
2-nitrofluoreen	607-57-8	210-138-5	TA 98
9-aminoakridiin	90-45-9	201-995-6	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
ICR 191	17070-45-0	241-129-4	TA 1537, TA 97 ja TA 97a
Kumeenvesinikperoksiid	80-15-9	201-254-7	TA 102
Mitomütsiin-C	50-07-7	200-008-6	WP2 uvrA ja TA 102
1-metüül-3-nitro-1-nitrosoguanidiin	70-25-7	200-730-1	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA (pKM101)
4-nitrokinoliin-1-oksiid	56-57-5	200-281-1	WP2, WP2uvrA ja WP2uvrA (pKM101)
Furiilfuramiid (AF2)	3688-53-7		Plasmidi sisaldavad tüved

Võidakse kasutada muid sobivaid positiivse kontrolli võrdlusaineid. Lähedasse keemilisse aineteklassi kuuluvate positiivsete keemiliste kontrollainete kasutamist tuleks kaaluda, kui selline aine on kättesaadav.

Tuleks kasutada negatiivseid kontrollaineid, mis sisaldavad üksnes lahustit või kandjaainet ilma katseaineta ja mida muidu manustatakse sarnasel viisil nagu katserühmade puhul. Lisaks sellele kasutatakse ka töötlemata kontrollkatseid, välja arvatud juhul, kui varasemad andmed kontrollaine kohta näitavad, et valitud lahusti ei indutseeri kahjulikke ega mutageenseid mõjusid.

▼B**1.5.3. Menetlus**

Vahetu kokkusegamise meetodil (1, 2, 3, 4), ilma metaboolse aktiveerimiseta, segatakse 2,0 ml külviagariga tavaliselt 0,05 ml või 0,1 ml katselahuseid, 0,1 ml värskeid bakterikultuure (mis sisaldavad ligikaudu 10^8 elujõulist rakku) ja 0,5 ml steriilset puhvrit. Metaboolse aktiveerimisega katse puhul segatakse tavaliselt 0,5 ml metaboolse aktiveerimise segu, mis sisaldab piisaval hulgal postmitokondriaalset fraktsiooni (vahemikus 5–30 mahuprotsenti metaboolse aktiveerimise segus) külviagari (2,0 ml) ja bakterite ja uuritava aine/katselahusega. Iga katseklaasi sisu segatakse ja külvatakse minimaalse agarinõu pinnale. Külviagarit võib lasta tahkestuda enne inkubatsiooni.

Eelinkubatsioonimeetodi puhul (2, 3, 5, 6) eelinkubeeritakse uuritav aine/katselahus uuritava tüvega (mis sisaldab ligikaudu 10^8 elujõulist rakku) ja steriilse puhvriga või metaboolse aktiveerimise süsteemiga (0,5 ml) enamasti 20 minutit või kauem 30–37 °C juures enne külviagariga segamist ja külvatakse minimaalse agariplaadi pinnale. Tavaliselt segatakse 0,05 või 0,1 ml uuritavat ainet/katselahust, 0,1 ml baktereid ja 0,5 ml S9-segu või steriilset puhvrit 2,0 ml külviagariga. Katseklaase tuleks täita õhuga eelinkubatsiooni ajal, kasutades selleks loksutit.

Varieerumise piisavaks hindamiseks tuleks kasutada kolme paralleelset plaati iga annuse korral. Kahe paralleelse plaadi kasutamine on aktsepteeritav siis, kui seda on teaduslikult põhjendatud. Plaadi juhuslikul kaotamisel ei tunnistata katset ilmtingimata kehtetuks.

Gaasilisi või lenduvaid aineid uuritakse sobiva meetodi abil, näiteks suletud kasvuanumates (12, 14, 15, 16).

1.5.4. Inkubatsioon

Kõiki antud katse anumaids tuleks inkubeerida 37 °C juures 48–72 tundi. Pärast inkubatsiooniperioodi loendatakse kokku revertantsete kolooniate arv plaadi kohta.

2. ANDMED**2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Tulemused tuleks esitada revertantsete kolooniate arvuna plaadi kohta. Revertantsete kolooniate arv nii negatiivsete (lahusti kontrollkatse ja töötlemata kontrollkatse, kui seda kasutatakse) kui ka positiivsete kontrollplaatide korral tuleks esitada. Üksikute plaatide korral loendatud bakterite arvud, revertantsete kolooniate keskmine arv plaadi kohta ja standardhälve tuleks esitada uuritava aine ning positiivsete ja negatiivsete (töötlemata ja/või lahusti) kontrollkatsete kohta.

Selget positiivset vastust ei ole vaja verifitseerida. Ebaselgeid tulemusi tuleks selgitada täiendaval uurimisel meelepäraselt muudetud katsetingimustes. Negatiivseid tulemusi kinnitatakse igal üksikjuhul eraldi. Neil juhtudel, kui negatiivsete tulemuste kinnitamist ei peeta vajalikuks, esitatakse põhjendus. Katse parameetrite muutmist hinnatud tingimuste vahemiku suurendamiseks tuleks arvesse võtta järelkatsetel. Katse parameetrid, mida võidakse muuta, hõlmavad kontsentratsioonivahemikku, manustamisviisi (vahetu kokkusegamise või vedeliku eelinkubatsiooni meetod) ja metaboolse aktiveerimise tingimusi.

▼B

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Positiivse tulemuse määramise kriteeriumid, nagu näiteks kontsentratsiooniga seotud uuritava vahemiku suurenemine ja/või ühes või mitmes kontsentratsioonis revertantsete kolooniate arvu reprodutseeruv suurenemine plaadil vähemalt ühe tüve korral süsteemis koos metaboolse aktiveerimisega või ilma selleta (23). Tulemuste bioloogilist tähtsust tuleks esmalt arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel (24). Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse saamiseks.

Uuritavat ainet, mille tulemused ei vasta eespool toodud kriteeriumidele, peetakse mittemutageenseks aineks käesolevas katses.

Kuigi enamikul katsetest on selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad saadud tulemused harvadel juhtudel kindlate otsuste tegemise uuritava aine aktiivsuse kohta. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud korduskatsete arvust sõltumata.

Bakterite pöördmutatsioonkatse positiivsed tulemused näitavad, et aine põhjustab punktmutatsioone aluste asendamise või *Salmonella typhimurium*'i ja/või *Escherichia coli* genoomi raaminihke abil. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et uuritav aine ei ole katsetingimustes mutageenne uuritavate liikide puhul.

3. ARUANDLUS

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Lahusti/kandjaaine:

- kandjaaine valiku põhjendus;
- uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui on teada.

Tüved:

- kasutatavad tüved;
- rakkude arv rakukultuuri kohta;
- tüvede omadused.

Katsetingimused:

- uuritava aine hulk plaadi kohta (mg plaadi kohta või µl plaadi kohta) annuse valiku põhjendusega ja plaatide arvuga ühe kontsentratsiooni kohta;
- kasutatavad söötmed;
- metaboolse aktiveerimise süsteemi tüüp ja koostis, sh selle vastuvõetavuse kriteeriumid;
- manustamismenetlused

Tulemused:

- toksilisuse tunnused;
- sadestuse tunnused;
- individuaalsed loendusandmed plaadi kohta;

▼B

- revertantsete kolooniate keskmine arv plaadi kohta ja standardhälve;
- doosi ja toime vaheline sõltuvus, võimaluse korral;
- võimalikud statistilised analüüsid;
- paralleelsete negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollkatsete andmed, sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed;
- varasemate negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollkatsete andmed, sh vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. VIITED

- 1) Arnes, B. N., McCann, J. and Yamasaki E. (1975), Methods of Detecting Carcinogens and Mutagens with the Salmonella/Mammalian-Microsome Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 31, pp. 347–364.
- 2) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.*, 113, pp. 173–215.
- 3) Gatehouse, D., Haworth, S., Cebula, T., Gocke, E., Kier, L., Matsushima, T., Melcion, C., Nohmi, T., Venitt, S. and Zeiger, E. (1994), Recommendations for the Performance of Bacterial Mutation Assays, *Mutation Res.*, 312, pp. 217–233.
- 4) Kier, L. D., Brusick D. J., Auletta, A. E., Von Halle, E. S., Brown, M. M., Simmon, V. F., Dunkel, V., McCann, J., Mortelmans, K., Prival, M., Rao, T. K. and Ray V. (1986), The Salmonella typhimurium/Mammalian Microsomal Assay: A Report of the U. S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 168, pp. 69–240.
- 5) Yahagi, T., Degawa, M., Seino, Y. Y., Matsushima, T., Nagao, M., Sugimura, T. and Hashimoto, Y. (1975), Mutagenicity of Carcinogen Azo Dyes and their Derivatives, *Cancer Letters* 1, pp. 91–96.
- 6) Matsushima, M., Sugimura, T., Nagao, M., Yahagi, T., Shirai, A. and Sawamura, M. (1980), Factors Modulating Mutagenicity Microbial Tests, in: *Short-term Test Systems for Detecting Carcinogens*, ed. Nor-poht K. H. and Garner, R. C., Springer, Berlin-Heidelberg-New York, pp. 273–285.
- 7) Gatehouse, D. G., Rowland, I. R., Wilcox, P., Callender, R. D. and Foster, R. (1980), Bacterial Mutation Assays, in: *Basic Mutagenicity Tests: UKEMS Part I Revised*, ed. D. J. Kirkland, Cambridge University Press, pp. 13–61.
- 8) Aeschacher, H. U., Wolleb, U. and Porchet, L. (1987), Liquid Preincubation Mutagenicity Test for Foods, *Food Safety*, 8, pp. 167–177.
- 9) Green, M. H. L., Muriel, W. J. and Bridges, B. A. (1976), Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutation Res.*, 38, pp. 33–42.
- 10) Hubbard, S. A., Green, M. H. L., Gatehouse, D. and Bridges, J. W. (1984), The Fluctuation Test in Bacteria, in: *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, 2nd Edition, ed. Kilbey, B. J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, pp. 141–161.

▼B

- 11) Thompson, E. D. and Melampy, P. J. (1981), An Examination of the Quantitative Suspension Assay for Mutagenesis with Strains of *Salmonella typhimurium*, *Environmental Mutagenesis*, 3, pp. 453–465.
- 12) Araki, A., Noguchi, T., Kato, F. and Matsushima, T. (1994), Improved Method for Mutagenicity Testing of Gaseous Compounds by Using a Gas Sampling Bag, *Mutation Res.*, 307, pp. 335–344.
- 13) Prival, M. J., Bell, S. J., Mitchell, V. D., Reipert, M. D. and Vaughan, V. L. (1984), Mutagenicity of Benzidine and Benzidine-Congener Dyes and Selected Monoazo Dyes in a Modified *Salmonella* Assay, *Mutation Res.*, 136, pp. 33–47.
- 14) Zeiger, E., Anderson, B. E., Haworth, S., Lawlor, T. and Mortelmans, K. (1992), *Salmonella* Mutagenicity Tests. V. Results from the Testing of 311 Chemicals, *Environ. Mol. Mutagen.*, 19, pp. 2–141.
- 15) Simmon, V., Kauhanen, K. and Tardiff, R. G. (1977), Mutagenic Activity of Chemicals Identified in Drinking Water, in *Progress in Genetic Toxicology*, D. Scott, B. Bridges and F. Sobels (eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 249–258.
- 16) Hughes, T. J., Simmons, D. M., Monteith, I. G. and Claxton, L. D. (1987), Vaporisation Technique to Measure Mutagenic Activity of Volatile Organic Chemicals in the Ames/*Salmonella* Assay, *Environmental Mutagenesis*, 9, pp. 421–441.
- 17) Matsushima, T., Matsumoto, A., Shirai, M., Sawamura, M., and Sugimura, T. (1979), Mutagenicity of the Naturally Occurring Carcinogen Cycasin and Synthetic Methylazoxy Methane Conjugates in *Salmonella typhimurium*, *Cancer Res.*, 39, pp. 3780–3782.
- 18) Tamura, G., Gold, C., Ferro-Luzzi, A. and Ames, B. N. (1980), Fecalase: A Model for Activation of Dietary Glycosides to Mutagens by Intestinal Flora, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 4961–4965.
- 19) Wilcox, P., Naidoo, A., Wedd, D. J. and Gatehouse, D. G. (1990), Comparison of *Salmonella typhimurium* TA 102 with *Escherichia coli* WP2 Tester strains, *Mutagenesis*, 5, pp. 285–291.
- 20) Matsushima, T., Sawamura, M., Hara, K. and Sugimura, T. (1976), A Safe Substitute for Polychlorinated Biphenyls as an Inducer or Metabolic Activation Systems, in: *In vitro Metabolic Activation in Mutagenesis Testing*, eds. F. J. de Serres et al. Elsevier, North Holland, pp. 85–88.
- 21) Elliot, B. M., Combes, R. D., Elcombe, C. R., Gatehouse, D. G., Gibson, G. G., Mackay, J. M. and Wolf, R. C. (1992), Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in *in vitro* Genotoxicity Assays, *Mutagenesis*, 7, pp. 175–177.
- 22) Maron, D., Katzenellenbogen, J. and Ames, B. N. (1981), Compatibility of Organic Solvents with the *Salmonella*/Microsome Test, *Mutation Res.*, 88, pp. 343–350.
- 23) Claxton, L. D., Allen, J., Auletta, A., Mortelmans, K., Nestmann, E. and Zeiger, E. (1987), Guide for the *Salmonella typhimurium*/Mammalian Microsome Tests for Bacterial Mutagenicity, *Mutation Res.*, 189, pp. 83–91.

▼B

- 24) Mahon, G. A. T., Green, M. H. L., Middleton, B., Mitchel, I., Robinson, W. D. and Tweats, D. J. (1989), Analysis of Data from Microbial Colony Assays, in: UKEMS Sub-Committee on Guidelines for Mutagenicity Testing, Part II. Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data, ed. Kirkland, D. J., Cambridge University Press, pp. 28–65.

▼B**B.15. MUTAGEENSUSE JA KARTSINOGEENSUSE UURING, GEENMUTATSIOON – *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

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

Haploidsete tüvede puhul on kasutusel otsemutatsiooni süsteemid, näiteks mõttes mutatsiooni punasest, adeniinsõltuvast mutandist (*ade-1*, *ade-2*), topelt adeniinsõltuvaks valgeks mutandiks, ja selektiivsed süsteemid, nagu resistentsuse induktsioon kanavnainile ja tsükloheksimiidile.

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

Diploidsete *S. cerevisiae* tüvede korral on ainukeseks laialdaselt kasutatavaks tüveks D₇ mis on homosügootne *ilv 1-92* suhtes.

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Puuduvad.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS*Ettevalmistused*

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

▼B**Metaboolne aktivatsioon**

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

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

*Uuringu tingimused***Test-tüvi**

Geenmutatsiooni uuringutes on kõige kasutatavamad haploidne tüvi XV 185-14C ja diploidne tüvi D₇. Teiste tüvede kasutamine võib olla kohane.

Rakusööde

Elulemuse ja mutantide arvu kindlakstegemiseks kasutatakse sobivaid rakusöötmeid.

Positiivsete ja negatiivsete kontrollide kasutamine

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

Ekspositsiooni kontsentratsioon

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

Inkubatsiooni tingimused

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

Spontaansete mutatsioonide sagedus

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

▼B**Replikatsioonide arv**

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

Protseduur

S. cerevisiae tüvede töötlus sooritatakse tavaliselt vedeltesti meetodil latentsete või paljunevate rakkudega. Algsed katsed tuleks teha paljunevate rakkudega: $1-5 \times 10^7$ rakku/ml eksponeeritakse testitavale kemikaalile kuni 18 tunni jooksul temperatuuril 28–37 °C, aeg-ajalt loksutades; piisav kogus metabolismi aktiveerivat süsteemi lisatakse töötamise käigus sobilikul ajahetkel. Töötamise lõpus rakud tsentrifugeeritakse, pestakse ja külvatakse sobivale rakusõotmele. Pärast inkubatsiooni hinnatakse alusklaase rakkude elulemuse ja mutatsioonide induktsiooni osas. Kui esimene katse on negatiivne, tuleks teha teine katse, kasutades latentse faasi rakke. Kui esimene katse on positiivne, kinnitatakse see sobiva sõltumatu uuringuga.

2. ANDMED

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

3. ARUANDLUS**3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

- kasutatav tüvi;
- katsetingimused: latentse faasis või paljunevad rakud, rakusõotme koostis, inkubatsiooni temperatuur ja kestus, metabolismi aktiveeriv süsteem;
- töötamise tingimused: ekspositsiooni tase, töötamise meetod ja kestus, töötamise temperatuur, positiivsed ja negatiivsed kontrollid;
- loendatud kolooniate arv, mutantide arv, elulemuse ja mutantide sagedus, doos/vastus suhe (kui oluline), andmete statistiline hinnang;
- tulemuste arutelu;
- järeldused.

3.2. HINNANG JA JÄRELDUSED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

▼B**B.16. MITOOTILINE REKOMBINATSIOON – SACCHAROMYCES CEREVISIAE****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

Saccharomyces cerevisiae mitootilist rekombinatsiooni saab määrata geenide vahel (üldisemalt geeni ja selle tsentromeeri vahel) või geenide sees. Esimest nimetatakse mitootiliseks ristsiirdeks, mille tulemuseks on retsiprooksed produktid, teist geeni konversiooniks, mis on kõige sagedamini mitteretsiprookne. Ristsiiret analüüsitakse tavaliselt retsessiivsete homosügootsete kolooniate produktsiooni järgi või heterosügootsete tüvede poolt produtseeritud sektorite järgi. Geeni konversiooni analüüsitakse prototroofsete revertantide produktsiooni järgi, mida toodavad kahte erinevat sama geeni defektset alleeli kandvad auksotroofsed heteroalleelsed tüved. Kõige sagedamini kasutatavad tüved mitootilise geeni konversiooni kindlakstegemiseks on D₄ (heteroalleelne *ade 2-s* ja *trp 5-s*), D₇ (heteroalleelne *trp 5-s*), BZ₃₄ (heteroalleelne *arg 4-s*) ja JD1 (heteroalleelne *his 4-s* ja *trp 5-s*). Mitootilist ristsiiret, mis produtseerib punaseid ja roosasid homosügootseid sektoreid, saab analüüsida D_{5-s} või D_{7-s} (mis mõõdavad ka mitootilist geeni konversiooni ja pöördmutatsiooni *ihv 1-92-s*), mõlemad tüved on heteroalleelsed *ade 2* komplementaarsete alleelide osas.

1.5. KVALITEEDIKRITERIUMID

Puuduvad.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS*Ettevalmistused*

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

Metaboolne aktivatsioon

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

▼B*Katsetingimused*

Test-tüved

Kõige sagedamini kasutatavad tüved on diploidsed D₄, D₅, D₇ ja JD₁. Teiste tüvede kasutamine võib olla kohane.

Rakusööde

Mitootilise rekombinatsiooni ja elulemuse sageduse hindamiseks kasutatakse sobivaid rakusöötmehid.

Positiivsete ja negatiivsete kontrollide kasutamine

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

Ekspositsiooni kontsentratsioonid

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

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

Inkubatsioonitingimused

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

Spontaanse mitootilise rekombinatsiooni sagedus

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

▼B**Replikatsioonide arv**

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

Protseduur

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

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

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

2. ANDMED

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

Tulemused tuleks kinnitada sõltumatu uuringuga.

Andmeid tuleks töödelda sobivaid statistilisi meetodeid kasutades.

3. ARUANNE**3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

- kasutatud tüvi;
- katsetingimused: latentse faasi või paljunevad rakud, kultuuri koostis, inkubatsiooni temperatuur ja kestus, metabolismi aktiveeriv süsteem;
- töötuse tingimused: ekspositsiooni kontsentratsioon, meetod ja töötuse kestus, töötuse temperatuur, positiivsed ja negatiivsed kontrollid;
- loendatud kolooniate arv, rekombinantide arv, elulemus ja rekombinantide sagedus, doosi/vastuse suhe (kui oluline), andmete statistiline hinnang;
- tulemuste arutelu;
- järeldused.

▼B

3.2. HINNANG JA JÄRELDUSED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

▼B**B.17. MUTAGEENSUS — *IN VITRO* IMETAJATE RAKKUDE GEENMUTATSIOONKATSE****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 476, *In Vitro* Mammalian Cell Gene Mutation Test (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

In vitro imetajate rakkude geenmutatsioonkatset saab kasutada keemiliste ainete põhjustatud geenmutatsioonide avastamiseks. Sobivate rakuliinide hulka kuuluvad hiire lümfoomirakud L5178Y, hiina hamstri rakuliinid CHO, CHO-AS52 ja V79 ning inimeste lümfoblastoidrakud TK6 (1). Kõnealustes rakuliinides enim kasutatavad geneetilised lõpp-punktid mõõdavad mutatsioone tümidinkinaasi-(TK) ja hüpoksantiin-guaaniinfosforibosültransferaasil (HPRT) ja ksantiin-guaaniinfosforibosültransferaasil (XPRT). TK-, HPRT- ja XPRT-mutatsiooni katsed avastavad erinevaid geneetilisi juhtumeid. TK ja XPRT autosomaalne asukoht võimaldab avastada geneetilisi juhtumeid (nt suuri deletsioone), mida ei avastata X-kromosoomides HPRT-lookuses (2, 3, 4, 5, 6).

In vitro imetajate rakkude geenmutatsioonkatses saab kasutada kindlakskujunenud rakuliinide või rakutüvede kultuure. Kasutatavad rakud valitakse kultuuris kasvamisvõime ja nende spontaanse mutatsioonisageduse stabiilsuse põhjal.

Tehtud *in vitro* katsed üldjuhul nõuavad eksogeenset metaboolset aktiveerimist. Kõnealune metaboolse aktiveerimise süsteem ei saa tervenisti jäljendada *in vivo* tingimusi imetajates. Tuleks hoolikalt vältida tingimusi, mille tulemused ei peegelda neile omaseid mutageensusi. Positiivsed tulemused, mis ei peegelda omast mutageensust, võivad tekkida pH, osmolaalsuse või tsütotoksilisuse kõrgete tasemetega muutuste põhjal (7).

Kõnealust katset kasutatakse imetajate võimalike mutageenide ja kantserogeenide skriinimiseks. Mitmed ühendid, mis annavad positiivseid tulemusi kõnealuses katses, on imetajate kantserogeenid; siiski ei ole kõnealuse katse ja kantserogeenide vahel täielikku korrelatsiooni. Korrelatsioon sõltub keemilisest aineklassist ning üha suuremal arvul esineb kantserogeene, mida ei avastata käesoleva katse abil, kuna need toimivad muude, mittegenotoksiliste mehhanismide või bakterirakkudes puuduvate mehhanismide abil (6).

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

1.2. MÕISTED

Päripidine mutatsioon: geenimutatsioon parentaalselt tüüpi mutantvormist, mille tulemusena kodeeritud valk kaotab ensümaatilise aktiivsuse või seda ensümaatilist aktiivsust muudetakse.

Aluspaari asendust põhjustavad mutageenid: ained, mis põhjustavad ühe või mitme aluspaari asendust DNAs.

Raaminihke mutageenid: ained, mis põhjustavad ühe või mitme aluspaari lisamist või deletsiooni DNA-molekulis.

▼B

Fenotüübi ekspressiooniaeg: periood, mille jooksul muutmata geeniproduktid lahkuvad äsja muteerunud rakkudest.

Mutatsioonsagedus: vaadeldud mutantrakkude arv, mis on jagatud elujõuliste rakkude arvuga.

Suhteline kogukasv: rakkude arvu suurenemine ajas võrrelduna rakkude kontrollpopulatsiooniga; arvutatud korrutisena, mille teguriteks on suspensioonikasv negatiivse kontrollkatse suhtes ja kloonimisefektiivsus negatiivse kontrollkatse suhtes.

Suhteline suspensioonikasv: rakkude arvu suurenemine ekspresiooniperioodi jooksul võrreldes negatiivse kontrollkatsega.

Elujõulisus: töödeldud rakkude kloonimisefektiivsus valiktingimustel plaatidele paigutamisel pärast ekspresiooniperioodi.

Ellujäämine: töödeldud rakkude kloonimisefektiivsus plaatidele paigutamisel töötlemisperioodi lõpus; ellujäämist väljendatakse tavaliselt rakkude kontrollpopulatsiooni ellujäämise suhtes.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Rakud, millel TK^{+/-} → TK^{-/-}-mutatsiooni tulemusel puudub tümidiinkinaas (TK), on resistentsed pürimidiini analoogi trifluorotümidiini (TFT) tsütotoksiliste mõjude suhtes. Tümidiinkinaasi suhtes spetsiifilised rakud on tundlikud TFT-le, mis takistab rakuainevahetust ja peatab edasise raku jagunemise. Seega mutantrakud on võimelised TFT esinemise korral vohama, samal ajal kui normaalsed rakud, milles on tümidiinkinaas, ei voha. Analooiliselt valitakse HPRT- või XPRT-defitsiidiga rakud 6-tioguaniniinile (TG) või 8-asaguaniiniinile (AG) resistentsuse alusel. Uuritava aine omadusi tuleb hoolikalt arvesse võtta, kui testitakse selektiivainega seotud alusanaloogi või ühendit mis tahes imetajate rakkude geenimutatsiooni katsetes. Näiteks tuleb uurida uuritava aine võimalikku kahtlustatavat selektiivset toksilisust mutantsetes või mittemutantsetes rakkudes. Valikusüsteemi/aine efektiivsust tuleb kinnitada, testides selektiivainega lähedase struktuuriga kemikaale (8).

Suspensioonis või monokihilises kultuuris olevad rakud allutatakse uuritava aine toimele, nii koos metaboolse aktiveerimisega kui ka ilma selleta, sobiva aja jooksul ning tsütotoksilisuse määramiseks külvatakse rakud ümber võimaldamaks fenotüübi avaldumist enne mutandi valikut (9, 10, 11, 12, 13). Tavaliselt määratakse tsütotoksilisus suhtelise kloonimisefektiivsuse (ellujäämise) või suhtelise rakkude kogukasvu mõõtmisega pärast töötlemisperioodi. Töödeldud katsekultuure hoitakse kasvukeskkonnas piisava aja jooksul, mis on igale valitud lookusele ja rakutübile iseloomulik, võimaldamaks saavutatud mutatsioonide fenotüüpide avaldumist võimalikult lähedal optimaalsele tasemele. Mutatsioonisagedus määratakse teadaoleva arvu rakkude külvamisel söötmesse, mis sisaldab selektiivainet, millega avastatakse mutantrakud, ja söötmesse, milles pole selektiivainet kloonimisefektiivsuse (elujõulisuse) määramiseks. Pärast piisavat inkubatsiooniaega loendatakse kolooniad. Mutatsioonisagedus saadakse selektiivses kasvukeskkonnas olevate mutantkolooniate arvu ja mitteselektiivses keskkonnas olevate kolooniate arvu alusel.

▼B

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Ettevalmistused**1.4.1.1. *Rakud*

Käesolevas katses kasutatakse erinevaid rakutüüpe, sh L5178Y, CHO, CHO-ASS2, V79 või TK6 rakkude subkloone. Käesolevas katses kasutatavad rakutüübid on näidanud tundlikkust keemiliste mutageenide suhtes, suurt kloonimisefektiivsust ja stabiilset spontaanet mutatsioonsagedust. Rakkudes kontrollitakse mükoplasma saastatust ja saastumise korral ei tohiks neid kasutada.

Katsed tuleb kavandada etteantud tundlikkusest ja usaldusväärsusest lähtudes. Rakkude, kultuuride ja uuritava aine kontsentratsioonide arv peaks peegeldama neid määratletud parameetreid (14). Töötlemise järel ellu jäänud ja igas katsefaasis kasutatavate elujõuliste rakkude minimaalne arv peaks põhinema spontaansel mutatsioonsagedusel. Üldjuhendiks on see, et rakkude arv on vähemalt kümnekordse spontaanse mutatsioonsageduse pöördväärtus. On soovitatav kasutada vähemalt 10^6 rakku. Kasutatava rakusüsteemi kohta peab olema piisavalt varasemaid andmeid, mis viitavad katse efektiivsuse vastavusele.

1.4.1.2. *Kasvukeskkonnad ja söötmed*

Tuleks kasutada sobivaid kasvukeskkondasid ja inkubatsioonitingimusi (kasvuandmed, temperatuur, CO₂ kontsentratsioon ja niiskus). Kasvukeskkonnad tuleks valida vastavalt katses kasutatavatele valikusüsteemidele ja rakutüüpidele. On eriti tähtis, et kasvutingimused valitakse nii, et tagatakse rakkude optimaalne kasv ekspressiooniperioodi ajal ning nii mutantsete kui mittemutantsete rakkude võime moodustada kolooniaid.

1.4.1.3. *Rakukultuuride ettevalmistamine*

Rakud paljundatakse tüvekultuuridest, mis on külvatud kasvukeskkonda ja inkubeeritud 37 °C juures. Enne käesoleva katse tegemist tuleb kultuurid puhastada varasematest mutantrakkudest.

1.4.1.4. *Metaboolne aktiveerimine*

Rakud allutatakse uuritava aine toimele nii vastava metaboolse aktiveerimissüsteemi olemasolu kui ka puudumise korral. Enim kasutatav süsteem on ensüüme indutseerivate ainetega, nt Aroclor 1254-ga (15, 16, 17, 18) või fenobarbitooni ja β-naftoflavooni seguga (19, 20), töödeldud näriliste maksast valmistatud postmitokondriaalne osa (S9), millele on lisatud kofaktor.

Tavaliselt kasutatakse postmitokondriaalset fraktsiooni kontsentratsioonis 1–10 mahuprotsenti lõplikus katsekeskkonnas. Metaboolse aktiveerimissüsteemi valik ja tingimused võivad sõltuda uuritava aine keemilisest aineklassist. Mõnel juhul on vaja kasutada rohkem kui üht postmitokondriaalset fraktsiooni kontsentratsiooni.

▼B

Osade meetodite korral, sh geneetiliselt muudetud rakuliini saamine, mis ekspresseerib spetsiifilisi aktiveerimisensüüme, võib avalduda endogeense aktiveerimise võime. Kasutatavate rakuliinide valik peab olema teaduslikult põhjendatud (nt tsütokroom P450 isoen-süümi tähtsus uuritava aine metabolismil).

1.4.1.5. *Uuritav aine/ettevalmistused*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajaduse korral lahjendada enne rakkude töötlemist. Vedelad uuritavad ained võib lisada vahetult katsesüsteemidesse ja/või lahjendada enne töötlemist. Tuleks kasutada uuritava aine värsked preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

1.4.2. **Katsetingimused**1.4.2.1. *Lahusti/kandjaaine*

Lahusti/kandjaaine ei tohiks uuritava ainega keemiliselt reageerida ning see peaks sobima rakkude eluvõimelisuse ja S9 aktiivsusega. Kui kasutatakse tuntud lahustist/kandjaainest erinevat, siis peab selle kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahusti/-kandjaaine kasutamist. Vees ebapüsivate ainete uurimisel kasutatavad orgaanilised lahustid peavad olema veevabad. Vett saab eemaldada molekulaarsõelte lisamisega.

1.4.2.2. *Toimimiseks kasutatavad kontsentratsioonid*

Suurima kontsentratsiooni määramisel on arvestatavad kriteeriumid tsütotoksilisus, lahustuvus katsesüsteemis ning pH või osmolaalsuse muutused.

Tsütotoksilisus määratakse põhikatses kindlaks nii metaboolse aktiveerimisega kui ka ilma selleta, kasutades sobivaid rakkude puhtuse ja kasvu indikaatoreid, nt suhtelist kloonimisefektiivsust (ellujäämine) või suhtelist kogukasvu. Tsütotoksilisust ja lahustuvust võib olla kasulik määrata eelkatses.

Tuleks kasutada vähemalt nelja analüüsivat kontsentratsiooni. Kui esineb tsütotoksilisust, peaksid need kontsentratsioonid katma vahemiku suurimast kontsentratsioonist vähimani või sellise kontsentratsioonini, mille korral mürgisus puudub; mis tavaliselt tähendab seda, et kontsentratsioonide erinevus üksteisest võib olla mitte rohkem kui vahemikus 2 kuni $\sqrt{10}$ asuv koefitsient. Kui maksimaalne kontsentratsioon põhineb tsütotoksilisusel, siis on selle tulemuseks ligikaudu 10–20 % (aga mitte vähem kui 10 %) suhteline ellujäämine (suhteline kloonimisefektiivsus) või suhteline kogukasv. Suhteliselt mitte-tsütotoksiliste ainete puhul peaks suurim katsekonsentratsioon olema 5 µl/ml, 5 mg/ml või 1,01 M, selle järgi, olenevalt sellest, milline neist on väiksem.

▼B

Suhteliselt lahustumatute ainetega tehakse katseid kasvukeskkonnatingimustes kuni lahustuvuspiirini või üle selle. Lahustumatus määratakse lõplikus katsekeskkonnas, kuhu on rakud paigutatud. On kasulik hinnata lahustuvust töötlemise alguses ja lõpus, kuna katseüsteemis võib lahustuvus töötlemise ajal muutuda rakkude, S9-seerumi jms mõjul. Lahustumatust saab avastada palja silmaga. Sadestus ei tohiks mõjutada tulemust.

1.4.2.3 *Kontrollkatsed*

Igas uuringus kasutatakse paralleelseid positiivseid ja negatiivseid (lahusti või kandjaaine) kontrollkatseid nii koos metaboolse aktiveerimisega kui ka ilma selleta. Kui kasutatakse metaboolset aktiveerimist, käsitatakse positiivse kontrollainena sellist kemikaali, mis eeldab aktiveerimist mutageense reaktsiooni saamiseks.

Positiivsete kontrollainete näited:

Metaboolse aktiveerimise tingimus	Lookus	Aine	CAS nr	EINECSI nr
Eksogeense metaboolse aktiveerimise puudumine	HPRT	Etüül-metaansulfonaat	62-50-0	200-536-7
		N-etüül-N-nitrosokarbamiid	759-73-9	212-072-2
	TK (väikesed ja suured kolooniad)	Metüül-metaansulfonaat	66-27-3	200-625-0
		XPRT	Etüül-metaansulfonaat	62-50-0
	N-etüül-N-nitrosokarbamiid		759-73-9	212-072-2
	Eksogeense metaboolse aktiveerimise olemasolu	HPRT	3-metüülkolantreen	56-49-5
Dimetüülnitrosoamiin			62-75-9	200-549-8
7,12-dimetüülbenzotratseen			57-97-6	200-359-5
TK (väikesed ja suured kolooniad)		Tsüklofosfamiid	50-18-0	200-015-4
		Tsüklofosfamiidmonohüdraat	6055-19-2	
		Benso(α)püreen	50-32-8	200-028-5
		3-metüülkolantreen	56-49-5	200-276-5
XPRT		Dimetüülnitrosoamiin (S9 kõrge taseme jaoks)	62-75-9	200-549-8
		Benso(α)püreen	50-32-8	200-028-5

Muid sobivaid positiivse kontrolli võrdlusaineid võib kasutada nt siis, kui laboril on andmebaas 5-bromo-2'-desoksüüridiini kohta (CASi nr 59-14-3, EINECSI nr 200-415-9), siis võib samuti kasutada kõnealust võrdlusainet. Lähedasse keemilisse aineklassi kuuluvate positiivsete kontrollkemikaalide kasutamist tuleks kaaluda, kui selline aine on kättesaadav.

▼B

Negatiivsed kontrollid, mis koosnevad üksnes kasvukeskkonnas olevast lahustist või kandjaainest ning mida on käsitlenud samal viisil kui katserühma, peaksid sisalduma. Lisaks sellele käsitletakse ka manustamata kontrollaineid, välja arvatud juhul, kui varasemad andmed kontrollaine kohta näitavad, et valitud lahustil ei ole kahjulikke ega mutageenseid mõjusid.

1.4.3. Menetlus

1.4.3.1. *Vastuvõtlikkus uuritavale ainele*

Rakukultuure manustatakse uuritavale ainele koos metaboolse aktiivimisega ja ilma selleta. Manustamisaeg peab olema sobiv (efektiivne aeg on tavaliselt 3–6 tundi). Manustamist võidakse jätkata ühe või mitme rakutsükli jooksul.

Igal uuritaval kontsentratsioonil võib kasutada kas kahte paralleelset või ühte kultuuri. Kui kasutatakse üksikkultuure, peaks kontsentratsioonide arv tõusma, et tagada analüüsitava kultuuride piisav arv (nt vähemalt 8 analüüsitava kontsentratsiooni). Tuleks kasutada paralleelseid negatiivseid (lahusti) kontrollkultuure.

Gaasilisi või lenduvaid aineid uuritakse sobiva meetodi abil, näiteks suletud kasvuanumates (21, 22).

1.4.3.2. *Ellujäämise, elujõulisuse ja mutatsioonisageduse mõõtmine*

Manustamisperioodi lõpus rakud pestakse ja kultiveeritakse ellujäämise määramiseks ja mutantse fenotüübi avaldumise võimaldamiseks. Tsütotoksilisuse suhtelise kloonimisefektiivsuse (ellujäämise) või suhtelise rakkude kogukasvu mõõtmise määramine algatatakse tavaliselt pärast manustamisperioodi.

Iga lookus on kindlaksmääratud minimaalse ajaga, et värskest põhjustatud mutantide fenotüüpide avaldumine oleks lähedal optimaalsele (HPRT ja XPRT eeldab vähemalt 6–8 päeva ja TK vähemalt kahte päeva). Rakud kasvatakse selektiivse(te) aine(te)ga söötmes mutantide arvu ja ilma selektiivse(te) aine(te)ta söötmes kloonimisefektiivsuse määramiseks. Elujõulisuse mõõtmine (kasutatakse mutatsioonisageduse arvutamiseks) algatatakse avaldumisaja lõpus, asetades rakke mitteselektiivsesse söötmesse.

Kui uuritav aine on positiivne L5178Y TK^{+/−} katses, tuleks kolooniate arv määrata vähemalt ühes uuritavas kultuuris (suurim positiivne kontsentratsioon) ning negatiivsetes ja positiivsetes kontrollides. Kui uuritav aine on negatiivne L5178Y TK^{+/−} katses, tuleks kolooniate arv määrata negatiivsetes ja positiivsetes kontrollides. Uurimustes, kus kasutatakse TK6TK^{+/−}, võidakse samuti kolooniate arvu määrata.

▼B2. **ANDMED**2.1. **TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Tulemuste hulgas peaksid olema tsütotoksilisuse ja elujõulisuse määramine, kolooniate arv ja mutatsioonisagedused katse- ja kontrollkultuuride kohta. L5178Y TK^{+/−} katse positiivse vastuse korral loendatakse kolooniad, kasutades selles väikeste või suurte kolooniate kriteeriume uuritava aine vähemalt ühel kontsentratsioonil (suurim positiivne kontsentratsioon) ning negatiivses ja positiivses kontrollis. Nii suurte kui ka väikeste kolooniate mutantide molekulaarset ja tsütogeenilist olemust on uuritud täpsemalt (23, 24). TK^{+/−} katsetes loendatakse kolooniad, kasutades normaalse kasvuga (suurte) ja aeglase kasvuga (väikeste) kolooniate kriteeriumeid (25). Mutantsed rakud, millel on kõige ulatuslikum geneetiline kahjustus, on pikendanud kahekordistumise aega ja seetõttu moodustavad väikeseid kolooniaid. Kõnealune kahjustus ulatub tüüpiliselt kogu geeni kaotamisest kuni karüotüüpiliselt nähtavate kromosoomide aberratsioonideni. Väikese koloonia mutantide moodustamine on seotud keemiliste ainetega, mis põhjustavad suuri kromosoomaberratsioone (26). Vähem tõsiselt mõjutatud mutantrakud kasvavad kiirusel, mis on sarnane parentaalsete rakkudega ja moodustavad suuri kolooniaid.

Ellujäämine (suhtelised kloonimisefektiivsused) või suhteline kogukasv on ära toodud. Mutatsioonisagedust väljendatakse mutantrakude arvuga ellujäänud rakkude arvu kohta.

Tulemused esitatakse iga üksiku kultuuri kohta. Lisaks esitatakse kokkuvõtte kõikidest tulemustest tabeli kujul.

Selget positiivset vastust ei ole vaja kontrollida. Ebaselgeid tulemusi tuleks selgitada täiendaval uurimisel meelepäraselt muudetud katsetingimustes. Negatiivseid tulemusi kinnitatakse igal üksikjuhul eraldi. Neil juhtudel, kui negatiivsete tulemuste kinnitamist ei peeta vajalikuks, esitatakse põhjendus. Katse parameetrite muutmist hinnatud tingimuste vahemiku suurendamiseks tuleks arvesse võtta ebaselgete või negatiivsete tulemuste järelkatsetel. Katse selliste parameetrite, mida võidakse muuta, hulka kuuluvad kontsentratsioonivahemik ja metaboolse aktiveerimise tingimused.

2.2. **TULEMUSTE HINDAMINE JA TÖLGENDAMINE**

On mitmeid kriteeriume positiivse tulemuse määramiseks, nagu nt mutatsioonisageduse kontsentratsiooniga seotud suurenemine või paljundamine. Tulemuste bioloogilist tähtsust tuleks esmalt arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel. Statistiline olulisus ei saa olla ainus määraarv teur positiivse vastuse jaoks.

Uuritavat ainet, mille puhul tulemused ei vasta eespool toodud kriteeriumidele, peetakse mittemutageenseks aineks käesolevas katses.

▼B

Kuigi enamikul katsetest on selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad saadud tulemused harvadel juhtudel kindlate otsuste tegemise uuritava aine aktiivsuse kohta. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud katsete kordamisest sõltumata.

Positiivsed tulemused *in vitro* imetajate rakkude geenmutatsiooni katses viitavad sellele, et uuritav aine põhjustab geenmutatsioone kasutatud kultiveeritud imetajate rakkudes. Paljundatav positiivne kontsentratsioon ja toime suhe on kõige tähelepanuväärsem. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et katsetingimuste põhjal ei põhjusta uuritav aine geenmutatsioone kasutatud kultiveeritud imetajate rakkudes.

3. **ARUANDLUS****KATSEARUANNE**

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Lahusti/kandjaaine:

- kandjaaine/lahusti valiku põhjendamine;
- uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui on teada.

Rakud:

- rakkude tüüp ja allikas;
- rakukultuuride arv;
- raku passaažide arv, vajaduse korral;
- rakukultuuri säilitamise meetodid, vajaduse korral;
- mükoplasma puudumine.

Katsetingimused:

- kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valimise põhimõtted, sh nt tsütotoksilisuse andmed ja lahustuvuse piirangud, kui need on olemas;
- kasvukeskkonna koostis, CO₂ kontsentratsioon;
- uuritava aine kontsentratsioon;
- lisatud kandjaaine ja uuritava aine hulk;
- inkubatsioonitemperatuur;
- inkubatsiooniaeg;
- manustamise kestus;
- rakutihedus manustamise ajal;
- metaboolse aktiveerimise süsteemi tüüp ja koostis, sh selle heakskiitmise kriteeriumid;
- positiivsed ja negatiivsed kontrollid;

▼B

- avaldumisperioodi pikkus (sh külvatud rakkude arv, subkultuurid ja söötmisskavad, vajaduse korral);
- selektiivsed ained;
- kriteeriumid, mille alusel uurimusi liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks;
- meetodid elujõuliste ja mutantrakkude loendamiseks;
- kolooniate kindlakstegemine, kus kolooniate arvu ja tüüpi võetakse arvesse (sh „väikeste” ja „suurte” kolooniate kriteeriumid, vajaduse korral).

Tulemused:

- toksilisuse tunnused;
- sadestuse tunnused;
- teave pH ja osmolaalsuse kohta uuritavale ainele vastuvõtlikkuse ajal, kui see on määratud;
- koloonia suurus, kui see on arvatud vähemalt negatiivsetest ja positiivsetest kontrollidest;
- labori valmisolek väikeste mutantide kolooniate avastamiseks L5178Y TK^{+/−} süsteemi abil, vajaduse korral;
- doosi ja toime suhe, võimaluse korral;
- võimalikud statistilised analüüsid;
- paralleelsete negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollide tulemused;
- varasemate negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollide andmed, sh vahemikud, keskvärtused ja standardhälbed;
- mutatsioonisagedus.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

- 1) Moore, M. M., DeMarini, D. M., DeSerres, F. J. and Tindal, 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 235–239.
- 7) Scott, D., Galloway, S. M., Marshall, R. R., Ishidate, M., Brusick, D., Ashby, J. and Myhr, B. C. (1991), Genotoxicity Under Extreme Culture Conditions. A report from ICPEMC Task Group 9, *Mutation Res.* 257, pp. 147–204.
- 8) Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. and Mavourmin, 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, pp. 225–251.
- 9) Li, A. P., Gupta, R. S., Heflich, R. H. and Wasson, J. S. (1988), A Review and Analysis of the Chinese Hamster Ovary/-Hypoxanthine Guanine Phosphoribosyl Transferase System to Determine the Mutagenicity of Chemical Agents: A Report of Phase III of the U. S. Environmental Protections Agency Gene-Tox Program, *Mutation Res.*, 196, pp. 17–36.
- 10) Li, A. P., Carver, J. H., Choy, W. N., Hsie, A. W., Gupta, R. S., Loveday, K. S., ÓNeill, J. P., Riddle, J. C., Stankowski, L. F. Jr. and Yang, L. L. (1987), A Guide for the Performance of the Chinese Hamster Ovary Cell/Hypoxanthine-Guanine Phosphoribosyl Transferase Gene Mutation Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 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, pp. 9–17.
- 12) Stankowski, L. F. Jr., Tindal, K. R., and Hsie, A. W. (1986), Quantitative and Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate – and ICR 191 -Induced Molecular Analyses of Ethyl Methanesulphonate – and ICR 191 Induced Mutation in AS52 Cells, *Mutation Res.*, 160, pp. 133–147.
- 13) Turner, N. T, Batson, A. G. and Clive, D. (1984), Procedure 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) Ariett, C. F., Smith, D. M., Clarke, G. M., Green, M. H. L., Cole, J., McGregor, D. B. and Asquith S. 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 Mazzacoro, A. (1977), Induction of 6-Thioguanine-Resistant Mutants in V79 Chinese Hamster Cells by Mouse-Liver Microsome-Activated Dimethylnitrosamine, *Mutation Res.* 46, pp. 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, pp. 347–364.

▼B

- 17) Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson A. G. and Brown M. M. M. (1979), Validation and Characterisation of the L5178Y/TK⁺ – Mouse Lymphoma Mutagen Assay System, *Mutat. Res.* 59, pp. 61–108.
- 18) Maron, D. M. and Ames, B. N. (1983), Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test, *Mutation Res.* 113, pp. 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, pp. 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, R. M. (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: *Ticc, 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, pp. 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, pp. 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 (TFT⁺) Mutants of L5178Y/TK⁺ – Mouse Lymphoma Cells, *Mutation Res.* 151, pp. 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, pp. 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, pp. 609–614.

▼B**B.18. DNA KAHJUSTAMINE JA PARANDAMINE – PLAANIVÄLINE
DNA SÜNTEES – IMETAJATE RAKKUEL *IN VITRO*****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

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

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Puuduvad.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused

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

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

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

Katsetingimused

Rakukultuuride arv

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

▼B**Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine**

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

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

Kasutatavad kontsentratsioonid

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

Rakud

Säilituskultuurides tuleb kasutada sobivat söödet, CO₂ kontsentratsiooni ja temperatuuri. Püsiliini rakke tuleb perioodiliselt kontrollida mükoplasmaga kontamineerituse suhtes.

Metaboolne aktiveerimine

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

Protseduur**Rakukultuuride valmistamine**

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

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

Inimese lümfotsüütide kultuurid valmistatakse selleks ette nähtud viisil.

▼B**Rakukultuuride töötlemine uuritavate ainetega****Primaarsed roti hepatotsüüdid**

Värskest isoleeritud roti hepatotsüüte töödeldakse uuritava ainega ettenähtud aja jooksul radioaktiivset tümiini $^3\text{H-TdR}$ sisaldavas söötmes. Töötuse lõpus eemaldatakse rakkudest sööde, nad loputatakse, fikseeritakse ja kuivatatakse. Alusklaasid kastetakse kiirgustundlikku vedelasse emulsiooni (alternatiivselt võib kasutada kile-emulsiooni), eksponeeritakse, ilmutatakse, värvitakse ja loendatakse.

Püsiliini rakud ja lümfotsüüdid

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

PDSi mõõtmine VSLi abil: enne uuritava ainega töötlemist tuleb blokeerida rakkude sisenemine S-faasi, nagu ülalpool kirjeldatud; seejärel tuleb rakke eksponeerida testitavale kemikaalile nagu autoradiograafia puhul. Inkubatsioonaja lõpus tuleb DNA rakkudest eraldada ja määrata kogu DNA hulk ning $^3\text{H-TdR}$ -ga liitumise ulatus.

Tuleb märkida, et kui ülalkirjeldatud meetodi puhul kasutatakse inimese lümfotsüüte, siis ei ole stimuleerimata kultuurides semikonservatiivse DNA replikatsiooni maha surumine vajalik.

*Analüüs**Autoradiograafilised määramised*

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

VSLi määramised

VSLi PDSi määramisel tuleb kasutada iga erineva kontsentratsiooni ja kontrolli puhul adekvaatset kultuuride arvu.

▼B

Kõiki andmeid tuleb kinnitada sõltumatu katsuga.

2. **ANDMED**

Andmed tuleb esitada tabelina.

2.1. **AUTORADIOGRAAFILISED MÄÄRAMISED**

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

^3H -TdR-i tsütoplasma seondumise ulatuse ja tuuma kohta tuleva hõbedaterade arvu kirjeldamiseks võib kasutada keskmist näitajat, mediaani ja moodväärtust.

2.2. **VSLI MÄÄRAMISED**

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

Andmeid tuleb hinnata vastavaid statistilisi meetodeid kasutades.

3. **ARUANDLUS**

3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

- kasutatud rakud, tihedus ja külvi number töötamise ajal, rakukultuuride arv;
- rakukultuuride säilitamiseks kasutatud meetodid, sealhulgas rakkude sööde, temperatuur ja CO_2 kontsentratsioon;
- uuritav aine, lahusti, kontsentratsioonid ja analüüsiks kasutatud kontsentratsioonide valiku põhjendus;
- metaboolsete aktivatsioonüsteemide detailid;
- töötluste kava;
- positiivsed ja negatiivsed kontrollid;
- kasutatud autoradiograafilised meetodid;
- rakkude S-faasi mineku blokeerimiseks kasutatud meetodid;
- DNA eraldamiseks ja DNA koguhulga määramiseks VSLiga kasutatud tehnikad;
- kus võimalik, anda doosi/vastuse suhe;
- statistiline hinnang;
- tulemuste arutelu;
- järeldused.

▼B

3.2. HINNANG JA JÄRELDUSED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

▼B**B.19. ÕDEKROMATIIDI VAHETUSE *IN VITRO* ANALÜÜS****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatus.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatus.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

Õdekromatiidi vahetuse (ÕKV) analüüs on lühiajaline test retsi-prooksete DNA vahetuste kindlakstegemiseks kahe õdekromatiidi vahel duplitseerivas kromosoomis. ÕKV väljendab DNA replikatsiooniproduktide väljavahetamist ilmselt homologsetes lookustes. Eeldatavasti sisaldab see vahetusprotsess DNA ahela lõhkumist ja uuesti ühendamist, ehkki tema molekulaarsest olemusest on vähe teada. ÕKV määramine nõuab õdekromatiidide erinevat märgistamist, mida võib teha bromodeoksuüridiini (BrdU) sisestamisega kromosomaalsesse DNAsse kahes rakutsüklis.

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

1.5. KVALITEEDIKRITERIUMID

Puuduvad.

1.6. UURINGUMEETODI KIRJELDUS*Ettevalmistused*

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

— Kasutada tuleks sobivat söödet ja inkubeerimise tingimusi (nt temperatuur, kultiveerimisnõud, CO₂ kontsentratsioon ja niiskus).

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

▼B

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

*Katsetingimused***Rakukultuuride arv**

Igas eksperimendi lõigus tuleb kasutada vähemalt kahte kultuuri.

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine

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

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

- otseselt toimiv ühend:

- etüülmetaansulfonaat;

- kaudselt toimiv ühend:

- tsüklofosfamiid.

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

Testimiseks kasutatavad kontsentratsioonid

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

*Protseduur***Rakukultuuride valmistamine**

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

▼B**Töötlemine**

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

Inimese lümfotsüütide kultuure töödeldakse semisünkroonse seisundi ajal.

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

Rakkude külvamine

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

Kromosoomide prepareerimine ja värvimine

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

Analüüs

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

2. ANDMED

Andmed tuleb esitada tabelis. ÕKVde arv iga metafasi kohta ja ÕKVde arv kromosoomi kohta igas metafasis tuleb märkida eraldi kõigi töödeldud ja kontrollkultuuride kohta.

Andmeid tuleb hinnata vastavate statistiliste meetoditega.

▼B3. **ARUANDLUS**3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

- kasutatud rakud, rakukultuuride säilitamise meetodid;
- katsetingimused: söötme koostis, CO₂ kontsentratsioon, uuritava aine kontsentratsioon, kasutatud lahusti, inkubeerimise temperatuur, töötuse aeg, kasutatud tuumakäävi inhibiitor, selle kontsentratsioon ja sellega töötlemise kestus, kasutatud imetajate aktivatsioonisüsteemi tüüp, positiivsed ja negatiivsed kontrollid;
- rakukultuuride arv igas katse lõigus;
- mikroskopeeritavate preparaatide valmistamise tehnika üksikasjad;
- analüüsitud metafaaside arv (andmed iga kultuuri kohta eraldi);
- keskmine ÕKV arv raku ja kromosoomi kohta (andmed iga kultuuri kohta eraldi);
- kriteeriumid ÕKV hindamiseks;
- annuste valiku põhjendus;
- võimaluse korral anda annuse/vastuse reaktsiooni suhe;
- statistiline analüüs;
- tulemuste arutelu;
- järeldused.

3.2. **HINNANG JA JÄRELDUSED**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

4. **VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

▼B**B.20. SUGULIITELISE RETSESIIVSE LETAALSUSE TEST
ÄÄDIKAKÄRBSSEL *DROSOPHILA MELANOGASTER*****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

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

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

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Puuduvad.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS*Ettevalmistused***Kärbseliinid**

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

Uuritav aine

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

▼B**Loomade arv**

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

Manustamisviis

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

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine

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

Ekspositsiooni tasemed

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

Protseduur

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

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

2. ANDMED

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

▼B

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

3. ARUANDLUS**3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

- liin: *Drosophila* kasutatud tüved või liinid, putukate vanus, töödeldud isaste arv, steriilsete isaste arv, saadud F_2 kultuuride arv, ilma järglaskonnata F_2 kultuuride arv, letaalset geeni kandvate kromosoomide arv, mis määratakse igas idurakkude staadiumis;
- töödeldud gruppide suuruse kindlaksmääramise kriteeriumid;
- katsetingimused: üksikasjalik töötluste ja katseplaani kirjeldus, ekspositsiooni tasemed, toksilisuse andmed, vajaduse korral negatiivne (lahusti) ja positiivne kontroll;
- letaalsete mutatsioonide hindamiskriteeriumid;
- kus võimalik, esitada ekspositsiooni/toime suhe;
- andmete hindamine;
- tulemuste arutelu;
- järeldused.

3.2. HINNANG JA JÄRELDUSED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

▼B**B.21. IMETAJARAKU TRANSFORMATSIOONITESTID *IN VITRO*****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Imetajarakukultuure on võimalik *in vitro* kasutada keemiliste mutageenide poolt indutseeritud fenotüübiliste muutuste avastamiseks. Neid mutageene seostatakse maliigse transformatsiooni tekkega *in vivo*. Laialt kasutatavateks rakkudeks on C₃H₁₀T_{1/2}, 3T3, SHE ja Fischeri roti rakuliinid. Testid põhinevad rakumorfoloogia muutuste, fookuse moodustumise või agarosgeelidel rakkude pesastumise muutuste avastamisel. Harvem tehakse uuringuid, mis avastavad kartsinogeensetele kemikaalidele eksponeeritud rakkudel teisi morfoloogilisi või füsioloogilisi muutuseid. Ükski *in vitro* testi tulemusnäitaja ei ole kinnitanud ühegi mehhanismi konkreetset süstemaatilist seost kasvajatega. Osad testsüsteemid on võimelised kindlaks tegema kasvajate promotoreid. Uuritavate ainete tsütotoksilisuse astet saab määrata, kui mõta aine toimet pesasid moodustavatele ühikutele (kloonide produktsiooni efektiivsusele) ja rakukultuuride kasvukiirusele. Tsütotoksilisuse määramine on oluline tõestamaks, et testitav kemikaal avaldab toksilist toimet rakkudele, vaatamata sellele, et rakkude maliigse transformatsiooni sagedust ei ole alati võimalik mõõta. Põhjuseks on osades katsetes kasutatav pikem inkubatsiooniaeg ja/või ümber külvamine teisele alusele.

1.5. KVALITEEDIKRITERIUMID

Puuduvad.

1.6. UURINGUMEETODI KIRJELDUS*Ettevalmistused***R a k u d**

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

K e s k k o n d

Transformatsiooni analüüsi tegemise keskkond ja katsetingimused peavad vastama vajadustele.

▼B**Uuritav aine**

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

Metaboolne aktivatsioon

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

*Katsetingimused***Positiivsete ja negatiivsete kontrollide kasutamine**

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

Positiivsete kontrollidena võib kasutada

— otsest toimet avaldavaid ühendeid:

— etüülmetaansulfonaat;

— β -propiolaktoon;

— kaudse toimega ühendeid:

— 2-atsetüülaminofluoreen;

— 4-dimetüülaminoasobenseen;

— 7,12-dimetüülbenzotratseen.

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

Kasutatavad kontsentratsioonid

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

▼B*Protseduur*

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

2. **ANDMED**

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

3. **ARUANDLUS**3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

- kasutatud rakuliin, rakukultuuride arv, rakukultuuride säilitusmeetodid;
- katsetingimused: uuritava aine kontsentratsioon, kasutatud lahusti, inkubatsiooni aeg, rakutihedus töötlemise ajal, imetaja metaboolset aktiivsust omava süsteemi tüüp, positiivsed ja negatiivsed kontrollid, jälgitud fenotüüpide kirjeldus, kasutatud selektiivsed ained (kui on asjakohane), annuste valiku põhimõte;
- eluvõimeliste ja mutantsete rakkude loendamise meetod;
- statistiline hindamine;
- tulemuste arutelu;
- järeldused.

3.2. **HINNANG JA JÄRELDUSED**

Vt üldtutvustus, B osa.

4. **VHITED**

Vt üldtutvustus, B osa.

▼B**B.22. NÄRILISTE DOMINANTSE LETAALSUSE TEST****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt üldtutvustus, B osa.

1.2. MÕISTED

Vt üldtutvustus, B osa.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

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

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

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Puuduvad.

1.6. UURINGUMEETODI KIRJELDUS*Ettevalmistused*

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

▼B*Katsetingimused***Manustamisviis**

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

Katseloomad

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

Arv ja sugu

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

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine

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

Annused

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

Piirtest

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

Protseduur

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

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

▼B

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

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

2. **ANDMED**

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

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

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

Andmeid hinnatakse vastavaid statistilisi meetodeid kasutades.

3. **ARUANDLUS**

3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

- kasutatud loomade liik, aretusliin, vanus, kehakaal, isaste ja emaste arv testitavas ja kontrollgrupis;
- testitav aine, lahusti, testitavad annused ja annuste valiku põhjendus, negatiivsed ja positiivsed kontrollid, andmed toksilisuse kohta;
- töötlemisviis ja töötluste ajakava;
- paarituste ajakava;
- paarituse toimumise määramiseks kasutatud meetod;
- lahangu aeg;
- dominantse letaalsuse hindamise kriteeriumid;
- võimaluse korral anda annuse/vastuse reaktsiooni suhe;

▼B

- statistiline analüüs;
- tulemuste arutelu;
- järeldused.

3.2. **HINNANG JA JÄRELDUSED**

Vt üldtutvustus, B osa.

4. **VIITED**

Vt üldtutvustus, B osa.

▼B**B.23. IMETAJATE SPERMATOGOONIDE KROMOSOOMABERRATSIOONKATSE****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 483, Mammalian Spermatogonial Chromosome Aberration Test (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

In *vivo* imetajate spermatogoonide kromosoomaberratsioonide katse eesmärk on ära tunda need ained, mis põhjustavad struktuurseid kromosoomaberratsioone imetajate spermatogoonide rakkudes (1, 2, 3, 4, 5). Struktuursed aberratsioonid võivad olla kahte tüüpi: kromosoom- või kromatiidaberratsioonid. Keemiliste mutageenide põhjustatud aberratsioonid on enamuses kromatiidaberratsioonid, aga esineb ka kromosoomaberratsioone. Käesolev meetod ei ole siiski mõeldud numbriliste aberratsioonide mõõtmiseks ja seda ei kasutata korrapäraselt sel eesmärgil. Kromosoommutatsioonid ja sellega seotud juhud on paljude inimeste geneetiliste haiguste põhjuseks.

Käesolev katse mõõdab kromosoomaberratsioone spermatogoonide idurakkudes ja seetõttu oodatakse, et need ennustaksid idurakkudes pärinevaid mutatsioone.

Käesolevas katses kasutatakse tavaliselt närlisi. Käesolev *in vivo* tsütogeneetiline katse avastab kromosoomaberratsioonid spermatogoonide mitoosides. Käesolevat meetodit ei kasutata muudes sihtkudedes.

Et avastada kromatiidaberratsioone spermatogoonide rakkudes, tuleks uurida esimest mitoosiraku jagunemist manustamise järel enne, kui need kahjustused kaovad järgmistes raku jagunemistes. Lisateavet manustatud spermatogoonide tüverakkudest saadakse meiootilise kromosoomi analüüsil kromosoomaberratsioonide suhtes diakineesi-metafaasis I, kui manustatud rakud muutuvad spermatotsüütideks.

Käesolev *in vivo* katse on määratud uurima, kas keharakkude mutageenid on ka aktiivsed idurakkudes. Lisaks sobib spermatogoonidega tehtav katse ka mutageensuse ohu hindamiseks, kuna see võimaldab *in vivo* metabolismi, farmakokineetika ja DNA parandusprotsesside tegurite arvessevõtmist.

Munandites on mitu spermatogoonide põlvkonda, mille tundlikkus keemiliste ainete mõjule vaheldub. Seetõttu esindavad avastatud aberratsioonid töödeldud spermatogoonide rakupopulatsioonide koguvastust, milles domineerib suurem hulk eristunud spermatogoonide rakke. Eri põlvkondadesse kuuluvate spermatogoonide kuulumine üldvereringesse sõltub nende asukohast munandites.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav aine või reaktiivne metaboliit ei pääse sihtkoesse, ei ole asjakohane kasutada käesolevat katset.

Vt ka üldist sissejuhatust B osas.

▼B

1.2. MÕISTED

Kromatiidaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis ilmneb üksikute kromatiidide katkemises või kromatiididevahelises katkemises või taasühinemises.

Kromosoomaberratsioon – struktuurne kromosoomikahjustus, mis ilmneb mõlema kromosoomi katkemises või katkemises ja taasühinemises samas kohas.

Tühik – akromaatiline kahjustus, mis on väiksem kui kromatiidi laius ja millel on minimaalne kromatiidide üleminek.

Numbriline aberratsioon – kasutatud rakkude tüüpilisest normaalset kromosoomiarvust erinev kromosoomide arv.

Polüploidus – haploidse kromosoomiarvu (n) paljukordsus, v.a diploidne arv (nt 3n, 4n jne).

Struktuurne aberratsioon – kromosoomstruktuuri muutus, mis on avastatud rakujaotuse metafaasi faasi mikroskoopilisel uurimisel ja mida täheldatakse deletsiooni ja fragmentidena, kromosoomisestest või -väliste muutustena.

1.3. KATSE PÕHIMÕTE

Loomadele manustatakse uuritavat ainet, kasutades sobivat manustamisteed, ja tapetakse sobiva aja möödumisel manustamisest. Enne tapmist antakse loomadele metafaasi peatavat ainet (nt kolhitsiini või ainet Colcemid®). Seejärel tehakse idurakkudest kromosoomipreparaadid ja need värvitakse ning metafaasi rakkude kromosoomaberratsioone analüüsitakse.

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. Ettevalmistused

1.4.1.1. Loomaliikide valik

Enamasti kasutatakse isaseid hiina hamstreid ja hiiri. Võib kasutada ka muude sobivate imetajate liikide isaseid loomi. Rakendatakse noorte tervete loomade enim kasutatavaid laboritüvesid. Uuringut alustades peaks loomade kaalumuutus olema minimaalne ja ei tohiks ületada ± 20 % keskmisest kaalust.

1.4.1.2. Elamis- ja söötmingimused

Kohaldatakse üldise sissejuhatus B osas toodud üldtingimusi, kuigi niiskuse eesmärk peaks olema 50–60 %.

1.4.1.3. Loomade ettevalmistamine

Terved noored täiskasvanud isasloomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserühmadesse. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomad identifitseeritakse individuaalselt. Loomi harjutatakse laboritingimustega vähemalt viis päeva enne uuringu alustamist.

▼B1.4.1.4. *Annuste ettevalmistamine*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajaduse korral lahjendada enne loomadele andmist. Vedelaid uuritavaid aineid võib doseerida vahetult või lahjendatakse neid enne doseerimist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on lubatav.

1.4.2. **Katsetingimused**1.4.2.1. *Lahusti/kandjaaine*

Lahusti/kandjaaine ei tohi avaldada toksilist mõju kasutatavate annuste korral ja ei tohi astuda keemilisse reaktsiooni uuritava ainega. Kui kasutatakse muid kui tuntud lahusteid/kandjaaineid, peab nende kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahustite/-kandjaainete kasutamist.

1.4.2.2. *Kontrollid*

Käesolevasse katsesse kaasatakse paralleelsed positiivsed ja negatiivsed (lahusti/kandjaaine) kontrollid. Kontrollrühma loomi käsitletakse sarnaselt katserühma loomadega, kuid neile ei anta uuritavat ainet.

Positiivsed kontrollid ei tohiks põhjustada struktuurseid aberratsioone *in vivo* spermatogoonide rakkudes manustamistasemetel, mis peaksid põhjustama avastatavat suurenemist taustaga võrreldes.

Positiivsete kontrollainete annused valitakse nii, et mõjud on selged, kuid need ei paljasta lugejale kohe kodeeritud objektiklaaside identiteeti. On aktsepteeritav, et positiivsed kontrollid võivad kasutada erinevaid manustamisteid kui uuritav aine ja proovid võetakse üksnes korra. Keemiliste ainete rühmaga seotud positiivsete keemiliste kontrollainete kasutamist tuleks kaaluda, kui sellised ained on kättesaadavad. Positiivsete kontrollainete näited:

Aine	CASi nr	EINECSi nr
Tsüklofosfamiid	50-18-0	200-015-4
Tsüklofosfamiidmonohüdraat	6055-19-2	
Tsükloheksüülamiin	108-91-8	203-629-0
Mitomütsiin-C	50-07-7	200-008-6
Akrüülamiidmonomeer	79-06-1	201-173-7
Trietüleenmelamiin	51-18-3	200-083-5

Üksnes lahustit või kandjaainet saanud või muul katserühmaga samalaadsel viisil töödeldud negatiivsetest kontrollidest võetakse proovid igal proovivõtukorral, välja arvatud siis, kui varasemad kontrollitulemused näitavad loomade väliste varieerumiste ja kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude esinemissageduste tunnustamist. Lisaks sellele käsitletakse ka töötlemata kontroole, välja arvatud juhul, kui varasemad või avaldatud andmed kontrolli kohta näitavad, et valitud lahustil/kandjaainel ei ole kahjulikke ega mutageenseid mõjusid.

▼B

1.5. MENETLUS

1.5.1. Loomade arv

Nii katse- kui ka kontrollrühmas on vähemalt viis analüüsitavaid looma.

1.5.2. Manustamiskava

Uuritavaid aineid manustatakse eelistatult ühel või kahel korral (nt ühekordse annusena või kahekordsete annustena). Uuritavaid aineid võib anda ka jagatud annustena, näiteks kaks annust ühel päeval kuni mõnetunnise vahega, et hõlbustada suurte ainekoguste andmist. Muud manustamiskavad peaksid olema teaduslikult tõestatud.

Suurimat annust saavas rühmas võetakse manustamise järel proove kahel korral. Kuna uuritav aine saab mõjutada rakutsükli kineetikat, siis võetakse proove üks kord varajasel ja teine kord hilisemal ajal ligikaudu 24–48 tunni jooksul pärast manustamist. Muude annuste, v.a suurim annus, puhul on proovide võtmise ajaks 24 tundi või 1,5 rakutsükli pärast manustamist, välja arvatud siis, kui muu proovivõtuaeg on sobivam mõjude avastamiseks (6).

Lisaks võib kasutada muid proovivõtuaegasid. Näiteks keemiliste ainete puhul, mis võivad põhjustada kromosoomi aeglustumist või võivad esile tuua S-faasist sõltumatu mõjusid, on sobivam varajsem proovide võtmise aeg (1).

Kordusmanustamiste sobivus tuleb määrata iga üksikjuhtumi puhul eraldi. Kordusmanustamise järel tuleb loomad tappa 24 tunni (1,5 rakutsükli) jooksul pärast viimast manustamist. Täiendavaid proovivõtuaegasid võib kasutada vajaduse korral.

Enne tapmist süstitakse loomade kõhukelmesse metafaasi peatavat ainet (nt ainet Colcemid® või kolhitsiini). Loomadelt võetakse seejärel proovid sobiva intervalli järel. Hiirte puhul on see intervall ligikaudu 3–5 tundi, hiina hamstritel ligikaudu 4–5 tundi.

1.5.3. Annused

Kui tehakse annuste vahemiku määramiseks uuring sobivate andmete puudumisel, siis tehakse uurimus samas laboris, kasutades samu liike, tüvesid, sugu ja manustamiskava, mida kasutatakse põhiuurimuses (7). Kui esineb mürgisus, kasutatakse kolme erinevat annust esimesest proovivõtust alates. Need annused peaksid hõlmama vahemikku suurimast kuni väiksema mürgisuseni või mürgisuse puudumiseni. Hilisemal proovivõtuajal on vaja kasutada üksnes suurimat annust. Suurim annus määratakse annusena, mis põhjustab sarnaseid mürgisusenähte, et samale manustamisrežiimile põhinevate suuremate annuste kasutamine võib põhjustada surma.

▼B

Ained, millel on spetsiifilised bioloogilised mõjud väikeste mittetoksiliste annustena (nt hormoonid ja mitogeenid), võivad olla erandiks annuse määramise kriteeriumidele ja neid tuleks hinnata iga üksiku juhtumi puhul eraldi. Suurim annus võib samuti põhjustada toksilisuse nähte spermatogoonide rakkudes (nt spermatogoonide mitooside suhe esimese ja teise meiootilise metafaasi on vähenenud; kõnealune vähenemine ei tohi ületada 50 %).

1.5.4. **Piirkatse**

Kui katse ühe annusega, milleks on vähemalt 2 000 mg/kg kehakaalu kohta päevas ja mida manustatakse ühekordse annusena või kahe annusena samal päeval, ei põhjusta täheldatavaid toksilisi mõjusid ja kui genotoksilisus ootuspäraselt põhineb struktuurselt seotud ainete andmetel, siis ei peeta kolme annuse taset käsitlevat täielikku uurimust vajalikuks. Inimeste ootuspärane vastuvõtlikkus võib viidata piirkatses kasutatavatest annustest suuremate annuste kasutamise vajadusele.

1.5.5. **Manustamine**

Uuritavat ainet manustatakse tavaliselt söögitoru kaudu või sobiva intubeerimise kanüüli abil või süstides kõhuõõnde. Samuti võib muid manustamismeetodeid aktsepteerida, kui need on põhjendatud. Vedeliku suurim kogus, mida saab söögitoru kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus ei tohiks ületada 2 ml/100 g kehakaalu kohta. Suurimate koguste kasutamine peab olema põhjendatud. Välja arvatud ärritavad või söövitavad ained, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katsekoguse varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks.

1.5.6. **Kromosoomipreparaat**

Kohe pärast tapmist võetakse rakususpensioonid ühest või mõlemast munandist, mis pannakse hüpotoonilisse lahusesse ja fikseeritakse. Seejärel rakud asetatakse objektiklaasidele ja värvitakse.

1.5.7. **Analüüs**

Iga looma puhul analüüsitakse vähemalt 100 väga levinud metafaasi (vähem kui 500 metafaasi rühma kohta). Seda arvu saab vähendada, kui esineb palju aberratsioone. Kõik objektiklaasid, sh positiivsete ja negatiivsete kontrollide omad, kodeeritakse sõltumatult enne mikroskoopilist analüüsi. Kui fikseerimise menetlused viivad tihti metafaasis olevate rakkude katkemise ja kromosoomide kaotamiseni, peaksid arvatavad rakud sisaldama tsentromeeride hulka, mis vastab arvule $2n \pm 2$.

2. **ANDMED**2.1. **TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Üksikute loomade andmed esitatakse tabelis. Katseühikuks on loom. Iga üksiku looma puhul hinnatakse struktuurseid kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude arvu ja kromosoomaberratsioonide arvu raku kohta. Eri tüüpi struktuursed kromosoomaberratsioonid tuleks loetleda ning mainitakse nende arvud ja esinemissagedused katse- ja kontrollkultuurides. Tühikud registreeritakse eraldi ja nende kohta antakse teavet, aga üldiselt ei kuulu need aberratsioonide üldsageduse hulka.

▼B

Kui vaadeldakse nii meioosi kui ka mitoosi, tuleks määrata kindlaks spermatogoonide mitooside suhe esimesse ja teise meiootilise metafaasi tsütotoksilisuse mõõduna kõikidest uuritavale ainele vastuvõtlikest loomadest ja negatiivsetest kontrollidest kokku 100 jaguneva rakuga proovis looma kohta võimalikule tsütotoksilisele mõjule osutamiseks. Kui üksnes mitoosi vaadeldakse, tuleks määrata mitootiline indeks vähemalt 1 000 rakust iga looma kohta.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Positiivse tulemuse saamiseks on mitmeid kriteeriume, nt kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude suhtelise arvu annusest tingitud suurenemine või kromosoomaberratsioone sisaldavate rakkude arvu selge suurenemine ühes annuses ühel proovivõtuajal. Tulemuste bioloogilist tähtsust tuleks esmalt arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel (8). Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse jaoks. Ebaselgeid tulemusi tuleks selgitada täiendaval uurimisel ootuspäraselt muudetud katsetingimustes.

Uuritavat ainet, mille tulemused ei vasta eespool toodud kriteeriumidele, peetakse mittemutageenseks aineks käesolevas katses.

Kuigi enamikul katsetest on selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad saadud tulemused harvadel juhtudel kindlate otsuste tegemise uuritava aine aktiivsuse kohta. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud katsete kordamisest sõltumata.

In vivo kromosoomaberratsiooni katsel saadud positiivsed tulemused viitavad sellele, et aine põhjustab struktuurseid kromosoomaberratsioone uuritud liikide idurakkudes. Negatiivsed tulemused viitavad sellele, et katsetingimuste põhjal ei põhjusta aine kromosoomaberratsioone uuritud liikide idurakkudes.

Tõenäosust, et uuritav aine või selle metaboliidid jõuavad sihtkoosse, tuleks arutada.

3. ARUANDLUS

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Lahusti/kandjaaine:

- kandjaaine valiku põhjendamine;
- uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui on teada.

Katseloomad:

- kasutatud liigid/tüved;
- loomade arv ja vanus;
- päritolu, elamistingimused, toitumine jne;
- loomade individuaalne kaal katse alustamisel, sh kehakaalu vahemik, keskväärtus ja standardhälve iga rühma kohta.

▼B

Katsetingimused:

- annuse määramise katse tulemused, kui need on läbi viidud;
- annuste valiku põhimõtted;
- manustamisviis;
- uuritava aine ettevalmistamise üksikasjad;
- uuritava aine manustamise üksikasjad;
- tapmisaja põhjendused;
- toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) muutmine tegelikuks annuseks (mg/kehakaalu kg kohta päevas), vajaduse korral;
- üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta;
- manustamis- ja proovivõtukavade detailne kirjeldus;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- metafaasi peatav aine, selle kontsentratsioon ja manustamise kestus;
- objektiklaaside valmistamise meetodid;
- aberratsioonide loendamise kriteeriumid;
- analüüsitud rakkude arv looma kohta;
- kriteeriumid, mille alusel uurimusi liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks.

Tulemused:

- toksilisuse tunnused;
- mitootiline indeks;
- spermatogoonide mitoosirakkude suhe esimesse ja teise meiootilisse metafaasi;
- aberratsioonide tüüp ja arv, antud iga looma kohta eraldi;
- aberratsioonide koguarv rühma kohta;
- aberratsioone sisaldavate rakkude arv rühma kohta;
- doosi ja toime suhe, võimaluse korral;
- võimalikud statistilised analüüsid;
- paralleelsed negatiivse kontrolli tulemused;
- varasemad negatiivsest kontrollist saadud tulemused ning vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed;
- paralleelse positiivse kontrolli tulemused;
- ploidsuse muutused, kui neid esineb.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

▼B

4.

VIITED

- 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, pp. 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, pp. 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, pp. 313–318.
- 7) Fielder, R. J., Allen, J. A., Boobis, A. R., Botham, P. A., Doe, J., Esdaile, D. J., Gatehouse, D. G., Hodson-Walker, G., Morton, D. B., Kirkland, D. J. and Richold, M. (1992), *Report of British Toxicology Society/UK Environmental Mutagen Society Working Group: Dose setting in In Vivo Mutagenicity Assays*, *Mutagenesis*, 7, pp. 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. R. K. (1989), *Statistical Analysis of In Vivo Cytogenetic Assays*, in: D. J. Kirkland (ed.), *Statistical Evaluation of Mutagenicity Test Data. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing, report, Part III*. Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 184–232.

▼B**B.24. HIIRE NAHALAIKUDE TEST****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

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

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Puuduvad.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS*Ettevalmistused*

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

Katsetloomad

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

▼B**Arv ja sugu**

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

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine

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

Manustamisviis

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

Annused

Kasutatakse vähemalt kahte annust, millest ühel ilmneb toksilisuse tunnuseid või mis põhjustab väiksemaarvulisi pesakondi. Mittetoksiliste kemikaalide puhul tuleb kasutada maksimaalset praktikas kasutatavat annust.

Protseduur

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

Analüüs

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

- a) kuni 5 mm suurusel valged laigud ventraalsel keskjoonel, mida peetakse rakkude surmamise tulemuseks (WMVS);
- b) kollased aguutivärvi laigud, mis on seotud piimanäärmete, genitaalide, kõri, õlavarre ja kubemepiirkonnaga ning lauba keskosaga, arvatakse olevat diferentseerumishäirete (MDS) tulemuseks ja
- c) hajusalt üle keha esinevad pigmenteerunud ja valged laigud, mida peetakse somaatiliste mutatsioonide (RS) tulemuseks.

▼B

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

Tuleb tähele panna kõiki ilmseid morfoloogilisi ebanormaalsusi järglaskonnas.

2. **ANDMED**

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

3. **ARUANDLUS**

3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

- ristamiseks kasutatud liinid;
- tiinete emaste arv katse- ja kontrollgrupis;
- keskmine pesakonna suurus uuritavat ainet saanute ja kontrollgrupis sündimise ja võõrutamise ajal;
- testitava kemikaali annus(ed);
- kasutatud lahusti;
- tiinuse päev, millal töötlus tehti;
- manustamisviis;
- hinnatud järglaskonna koguarv, WMVS, MDS ja RS muutusi kandvate järglaste arv eksperimentaal- ja kontrollgrupis;
- kõik morfoloogilised anomaaliad;
- võimaluse korral anda annuse/toime suhe RS muutuste kohta;
- statistiline analüüs;
- tulemuste arutelu;
- järeldused.

3.2. **HINNANG JA JÄRELDUSED**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

4. **VIITED**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

▼B**B.25. HIIRE PÄRILIK TRANSLOKATSIOON****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

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

1.5. KVALITEEDIKRITERIUMID

Puuduvad.

1.6. UURINGUMEETODI KIRJELDUS*Ettevalmistused*

Testitavad kemikaalid lahustatakse isotoonilises soolalahuses. Kui ained on vees lahustumatud, siis lahustatakse või suspendeeritakse nad vastavates lahustites. Kasutatakse värskest valmistatud testitavate ühendite lahuseid. Kui lahustit kasutatakse annustamise lihtsustamiseks, ei tohi sellel olla koostoimet testitava kemikaaliga, samuti ei tohi see mõjuda toksiliselt.

Manustamisviis

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

Katseloomad

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

Katsesse valitakse terved suguküpsed loomad.

▼B**Loomade arv**

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

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

Negatiivsete ja positiivsete kontrollide kasutamine

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

Annused

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

Protseduur**Uuritava aine manustamine ja paaritamine**

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

Translokatsiooni heterosügootsuse testimine

Kasutatakse ühte kahest võimalikust meetodist:

- F_1 järglaskonna viljakuse testimine ja järgnev võimalike translokatsiooni kandjate kindlakstegemine tsütogeneetilise analüüsi abil;
- kogu isase F_1 järglaskonna tsütogeneetiline analüüs ilma eelneva fertiilsuse testimisel põhineva selektsioonita.

a) Viljakuse testimine

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

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

▼B

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

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

Emaka sisu analüüsimine: pesakonna suuruse vähenemine translokatsiooni kandjatel on põhjustatud loodete embrüonaalsest hukkumisest, nii et surnud implantaatide suur arv peegeldab translokatsiooni esinemist testitaval loomal. Igat testitavat F_1 isaslooma paaritatakse 2–3 emasega. Viljastumine tehakse kindlaks igahommikuse vaginaalkorkide olemasolu kontrollimisega. Emased surmatakse 14–16 päeva pärast ning nende emakates loendatakse elusad ja surnud implantaadid.

b) Tsütogeneetiline analüüs

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

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

2.

ANDMED

Andmed esitatakse tabelis.

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

▼B

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

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

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

XO emaste puhul registreeritakse keskmine pesakonna suurus, sugude suhe F_1 järglaskonnas ja tsütogeneetilise analüüsi tulemused.

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

Esitatakse negatiivsete ja positiivsete kontrollide testimisandmed.

3. ARUANDLUS

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

- hiirte liin, loomade vanus, töödeldud loomade kaalud;
- mõlemast soost vanemloomade arv katse- ja kontrollgrupis;
- katsetingimused, detailne aine manustamise kirjeldus, annused, lahustid, paarituste skeem;
- järglaste arv ja sugu ühe emase kohta, saadud järglaste arv ja sugu translokatsiooni analüüsil;
- translokatsiooni analüüsi aeg ja kriteeriumid;
- translokatsiooni kandjate arv ja detailne kirjeldus, kus võimaluse korral oleks antud ka paarituste andmed ja emaka sisaldise uurimise andmed;
- tsütogeneetilised protseduurid ja mikroskoopilise uuringu detailid, eelistatavalt koos piltidega;
- statistiline hinnang;
- tulemuste arutelu;
- järeldused.

▼B

3.2. HINNANG JA JÄRELDUSED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

▼B**B.26. SUBKROONILISE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE – SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 90PÄEVANE UURING NÄRILISTEL****1. MEETOD**

Käesolev subkroonilise suukaudse toksilisuse uurimismeetod lähtub juhendist OECD TG 408 (1998).

1.1. SISSEJUHATUS

Kemikaali toksiliste omaduste määramisel ja hindamisel võib teha subkroonilise suukaudse toksilisuse katseid, kasutades kordusdoose pärast seda, kui toksilisuse kohta on akuutsetest või 28päevastest kordusdoosidega toksilisuse katsetest saadud esialgne teave. 90päevane uuring annab teavet võimalike terviseriskide kohta, mis võivad tõenäoliselt tekkida korduva kokkupuute korral pikaajalise perioodi jooksul alates võõrutusjärgsest küpsemisest kuni täisealiseks arenemiseni. Uuring annab teavet toksilisuse peamiste mõjude kohta, tuvastab sihtorganid ja akumuleerumisvõimaluse ja võib anda katsealustele organismidele täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni väärtuse, mida saab kasutada doositasemete valimisel krooniliste mõjude uurimisel ja kokkupuutel inimestega ohutuskriteeriumide väljatöötamisel.

Meetod asetab lisarõhu neuroloogilistele küsimustele ja selle abil saadakse teavet immunoloogilist ja paljunemisvõimet puudutavate mõjude kohta. Samuti rõhutatakse vajadust teha loomade hoolikas kliiniline läbivaatus, et hankida võimalikult palju teavet. Kõnealune uuring peaks võimaldama määrata neid kemikaale, mis on võimelised põhjustama neurotoksilist ja immunoloogilist mõju või mõju paljunemisorganitele, mis võib tagada edasise sügavuti uuringu.

Vt ka üldise sissejuhatus B osa.

1.2. MÕISTED

Doos – uuritava aine manustatav kogus. Doosi väljendatakse massina (g, mg) või uuritava aine massina katsealuse looma kaaluühiku kohta (nt mg/kg) või toidus oleva püsikontsentratsioonina (ppm).

Doseerimine – üldmõiste, mis hõlmab doosi, manustamise sagedust ja doseerimise kestust.

NOAEL – lühend sõnadest „no observed adverse effect level” ehk doosi kõige kõrgem tase, mis vastab katseorganismidele täheldatavat toimet mitteavaldavale kontsentratsioonile.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritavat ainet manustatakse katseloomade erinevatele rühmadele suu kaudu iga päev astmeliselt suurenevates doosides, üks doosi suurus rühma kohta 90 päeva jooksul. Manustamisperioodi jooksul jälgitakse loomi hoolikalt mürgitusnähtude suhtes. Loomad, kes surevad või katse jooksul tapetakse, lahatakse ja uuringu lõppedes tapetakse ja lahatakse ka need loomad, kes jäid ellu.

▼B

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. Loomade ettevalmistamine

Kasutada tuleks terveid loomi, kes on labororingimustega vähemalt viie päeva jooksul kohanenud ning keda ei ole varem uuringutes kasutatud. Katseloomi tuleks kirjeldada vastavalt nende liigile, liinile, päritolule, soole, kaalule ja/või vanusele. Loomad tuleks kontroll- ja menetlusrühmadesse paigutada juhuslikult. Puurid tuleks asetada nii, et puuri ümberasetamisega seotud võimalikud mõjud oleks minimaalsed. Igale loomale peab määrama unikaalse identifitseerimisnumbri.

1.4.2. Dooside ettevalmistamine

Uuritavat ainet manustatakse kunstlikult või koos toidu või joogi-veega. Suukaudse manustamise meetod sõltub uuringu eesmärgist ja uuritava aine füüsikalise-keemilistest omadustest.

Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav aine sobivas vehiikelis. Soovitatakse, et võimaluse korral tuleks kõigepealt kasutada vesilahust/suspensiooni, seejärel õlilahust/emulsiooni (nt maisiõli) ja siis lahustamist teistes vehiikelites. Mittevesilahuseliste vehiikelite puhul peab teadma kandeaime toksilisi omadusi. Kindlaks tuleks määrata uuritava aine püsivus manustamise tingimustes.

1.4.3. Katsetingimused

1.4.3.1. Katseloomad

Näriolistest eelistatakse rotte, kuigi kasutada võib ka teisi närilisi, nt hiiri. Katseloomadena tuleks kasutada üldkasutatavate tervete täiskasvanud laboratooriumiloomade aretusliine. Emasloomad peaksid olema nullpaarid ja nad ei tohiks olla tiined. Doseerimisega tuleks alustada võimalikult kohe pärast võõrutamist ja igal juhul enne loomade üheksanädalaseks saamist. Uuringu alguses peaks loomade kaalu erinevus olema minimaalne ega tohiks ületada $\pm 20\%$ kummastki soost loomade keskmisest kaalust. Kui uuring tehakse eeluuringuna pikaajalise kroonilise toksilisuse uuringu raames, tuleks mõlemas uuringus kasutada samast aretusliinist ja sama päritoluga loomi.

1.4.3.2. Arv ja sugu

Igal doositasemel tuleks kasutada vähemalt 20 looma (10 emast ja 10 isast). Kui osa loomi on kavas katse käigus tappa, tuleks loomade arvu enne katse lõppu tapetavate loomade arvu võrra suurendada. Tuginedes eelnevatele teadmistele kemikaali või selle lähedase analoogi kohta, tuleks kaaluda kümneloomalise (viis kummastki soost) satelliitrühma lisamist kontrollrühma ja suurima doosi rühma, et jälgida pärast manustamisperioodi lõppu mis tahes toksilise toime pöörduvust või püsivust. Selle menetlusjärgse perioodi kestus tuleks dokumenteerida vastavalt täheldatud mõjudele.

▼B1.4.3.3. *Annused*

Uuringus tuleb kasutada vähemalt kolme doositaset ja uuringuga samal ajal peab tegema ka kontrolli, välja arvatud siis, kui tehakse piirsalduskatse (vt 1.4.3.4). Doositasemed võivad põhineda kordusdoosi või vahemiku leidmise uuringu tulemustel ja peaksid arvesse võtma uuritava aine või sellega seotud materjalide kohta olemasolevat toksikoloogilist ja toksikokineetilist teavet. Kui uuritava aine füüsikalised-keemilised omadused või bioloogiline mõju ei piira suurima doosi valimist, tuleb doositase valida nii, et sellega kaasneks mürgitus, kuid et see ei põhjustaks surma ega tõsiseid kannatusi. Dooside suurused tuleks valida kahanevas järjekorras eesmärgiga näidata iga doosiga seotud reaktsioonid ja katseorganismidele tähtsamat toimet mitteavaldav sisaldus (NOAEL) kõige madalama annuse korral. Kahanevate annuste puhul on tavaliselt optimaalsemad kahe- kuni neljakordsed intervallid ja väga pikkadele intervallidele (nt kui koefitsient on 6–10) eelistatakse tavaliselt neljanda katserühma lisamist.

Kontrollrühm peab olema rühm, millele ei manustata, või rühm, mis saab vehiikelit siis, kui uuritava aine manustamisel kasutatakse vehiikelit. Kontrollrühma loomi tuleb käidelda samal viisil kui katserühmade loomi, välja arvatud see, et neile ei anta uuritavat ainet. Kui kasutatakse vehiikelit, manustatakse kontrollrühmale vehiikelit suurimas kasutatavas ruumalas. Kui uuritavat ainet antakse koos toiduga ja see põhjustab toidu tarbimise vähenemist, võib paaristoidetav kontrollrühm olla kasulik selleks, et teha vahet maitsest või katsemudelis aset leidnud toksikoloogilistest muutustest põhjustatud vähenemistel.

Vastavalt vajadusele tuleks arvesse võtta järgmisi vehiikeli ja teiste lisandite omadusi: mõju uuritava aine imendumisele, jaotuvusele, ainevahetusele või retentsioonile; mõju uuritava aine keemilistele omadustele, mis võivad muuta selle toksilisi omadusi; ja mõju loomade toidu või vee tarbimisele või nende toitumisseisundile.

1.4.3.4. *Piirsalduskatse*

Kui katses ei tuvastata käesolevas uuringus kirjeldatud menetlusega päevadoosil 1 000 mg kehakaalu kg kohta tähtsat toksilist toimet ja kui toksilisus ei ole samalaadse struktuuriga ainete osas saadud andmete põhjal ootuspärane, ei loeta suurema doosiga uuringut vajalikuks. Teha võib piirsalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

1.5. ANALÜÜSI KAIK

1.5.1. **Doseerimine**

Loomadele doseeritakse uuritavat ainet seitsmel päeval nädalas ja 90 päeva jooksul. Mis tahes muu doseerimismeetodi, nt viis päeva nädalas, kasutamist tuleb põhjendada. Kui uuritavat ainet manustatakse kunstlikult, peaks seda tegema loomadele ühe doosi kaupa, kasutades maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Maksimalne vedelikumaht, mida võib korraga loomale manustada, sõltub katseloomade suurusest. Maht ei tohiks ületada 1 ml kehakaalu 100 g kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, mille puhul võib kasutada ka suhet 2 ml kehakaalu 100 g kohta. Välja arvatud ärritavate ja söövitavate ainete puhul, millel on suurematel kontsentratsioonidel tavaliselt halvem toime, tuleks katsemahu varieeruvus muuta minimaalseks sellega, et kõikide annuste puhul kohandatakse ühesuguse mahu tagamiseks kontsentratsiooni.

▼B

Ainete puhul, mida manustatakse toidu või joogiveega, on oluline tagada, et toiduga kasutatavad uuritava aine kogused ei häiriks tavalist toitumise või joogivee tasakaalu. Kui uuritavat ainet manustatakse toiduga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni toidus (ppm) või püsiva suurusega doosi vastavalt looma kehakaalule; tuleks täpsustada, millist võimalust kasutatakse. Kui ainet manustatakse kunstlikult, tuleks doos anda igal päeval samal ajal ning seda tuleks vajaduse korral kohandada, et looma kehakaalu suhtes säiliks püsiv doositase. Kui 90päevane uuring tehakse eeluuringuna pikaajalise kroonilise toksilisuse uuringu raames, tuleks mõlema uuringu puhul kasutada samasugust toitu.

1.5.2. Vaatlused

Vaatlusperiood peaks kestma vähemalt 90 päeva. Järelvaatluse jaoks planeeritud satelliitühma loomad tuleks hoida sobiva perioodi jooksul menetlemata, et oleks võimalik avastada toksilise toime pööratavust või püsivust.

Vähemalt üks kord päevas tuleks teha üldine kliiniline läbivaatus, eelistatavalt igal päeval samal ajal (samadel aegadel), arvestades eeldatavat mõju kõrgeperioodil pärast doseerimist. Loomade kliiniline seisund tuleks dokumenteerida. Vähemalt kaks korda päevas, tavaliselt iga päeva alguses ja lõpus, tuleks kontrollida, kas loomad on haigestunud või surnud.

Vähemalt üks kord enne esimest kokkupuudet (et võimaldada subjektide omavahelist kõrvutamist) ja pärast seda kord nädalas tuleks teha kõikide loomade üksikasjalik kliiniline läbivaatus. Need vaatlused tuleks teha väljaspool puuri, eelistatavalt selleks ette nähtud kohas ja iga kord samal ajal. Tulemused tuleks hoolikalt üles märkida, kasutades selleks võimaluse korral katselabori poolt fikseeritud hindamisüsteeme. Tuleks püüda tagada, et vaatlustingimuste varieeruvus oleks võimalikult minimaalne. Tuvastatud märgid peaksid hõlmama lisaks muule muutusi nahal, karvades, silmades, limaskestas, ekstraktide ja eritiste esinemist ning autonoomseid toiminguid (nt pisarate vool, piloereksioon, pupillide suunis, ebaregulaarne hingamine). Samuti tuleks üles märkida muudatused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad endaga ümberkäimisele reageerivad, samuti kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid (nt ülemäärane karvastiku hooldus, ringiratast keerlemine) või kummaline käitumine (nt enese vigastamine, vastupidine käitumine) (1).

Oftalmoloogiline läbivaatus, kasutades silmapeeglit või samalaadset sobivat vahendit, tuleks teha enne uuritava aine manustamist ja uuringu lõppedes eelistatavalt kõikidel loomadel, kuid vähemalt suure doosiga rühmas ja kontrollrühmas. Kui silmades avastatakse muutusi, tuleb läbi vaadata kõik loomad.

Kokkupuuteperioodi lõpupoole, kuid mitte varem kui 11. nädalal, tuleks läbi viia sensoorse reageerimise kontroll erinevat liiki ärritajatele (1) (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptori ärritustele) (2, 3, 4), kinnihaaramise tugevuse (5) ja motoorse aktiivsuse (6) hindamine. Võimalike meetodite täpsemad üksikasjad on esitatud vastavates viidetes. Siiski võib kasutada ka muid meetodeid kui need, millele viidatakse.

Funktsionaalsed vaatlused, mis viiakse läbi uuringu lõpupoole, võib ka ära jätta, kui on olemas teiste uuringute funktsionaalsete vaatluste andmed ja kui igapäevased kliinilised vaatlused ei toonud esile mingeid funktsionaalseid vaegusi.

▼B

Erandkorras võib funktsionaalsed vaatlused ära jätta rühmade puhul, millel esineb toksilisuse märke niisugusel määral, et see takistaks märkimisväärselt funktsionaalsete katsete läbiviimist.

1.5.2.1. *Kehakaal ja toidu/vee tarbimine*

Kõiki loomi tuleks kaaluda vähemalt kord nädalas. Toidu tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat ainet manustatakse joogiveega, tuleks vee tarbimist samuti vähemalt kord nädalas mõõta. Vee tarbimise mõõtmist võib kaaluda ka selliste toitumis- või sunnitsöötmise uuringute korral, mille jooksul võib joomisaktiivsuses esineda muutusi.

1.5.2.2. *Hematoloogia ja kliiniline biokeemia*

Vereproovid tuleks võtta kindlaksmääratud kohast ja neid tuleks vajaduse korral säilitada sobivates tingimustes. Katseperioodi lõpus võetakse proovid vahetult enne loomade tapmist või selle käigus.

Katseperioodi lõpul või kui võetakse vahepealseid vereproove, tuleks teha järgmised hematoloogilised uuringud: hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide üld- ja diferentseeritud arv, vereliistakute arv ja vere hüübimisaja/hüübimisvõime mõõtmine.

Kliinilised biokeemilised analüüsid peamiste toksiliste mõjude uurimiseks kudedes ja eelkõige nende toime uurimisel neerudele ja maksale tuleks teha vereproovidega, mis on võetud loomadelt vahetult enne tapmist või selle ajal (välja arvatud loomad, kes leiti surevana ja/või tapeti katse ajal). Nii nagu hematoloogilisel uuringul, võib võtta ka kliiniliste biokeemiliste katsete jaoks vahepealseid proove. Üks öö enne vereproovi võtmist soovitatakse loomadel paastuda⁽¹⁾. Plasma või seerumiuringud peavad hõlmama naatriumi, kaaliumi, glükoosi, üldkolesterooli, karbamiidi, kreatiniini, üldvalku ja albumiini, vähemalt kahte hepatotsellulaarsele toimele osutavat ensüümi (näiteksalaniinaminotransferaas, aspartaataminotransferaas, aluseline fosfataas, gammaglutamüültranspeptidaas, ja sorbitooldehüdrogenaas). Teha võib ka muude ensüümide (maksa või teiste organite) ja sapphapete mõõtmisi, mis võivad teatavatel tingimustel anda kasulikku teavet.

Alternatiivselt on uuringu viimasel nädalal võimalik loomadelt uriiniproovide kogumise teel teha järgmisi uriinianalüüse: välimus, ruumala, osmolaalsus või suhteline tihedus, pH, valk, glükoos ja veri/vererakud.

Lisaks sellele tuleks uurida, kas seerumis on üldistele koekahjustustele osutavaid markereid. Muud määramised, mis tuleks teha juhul, kui uuritava aine teadaolevad omadused võivad mõjutada või mõjutavad eeldatavasti sellega seotud ainevahetuse profiili, hõlmavad kaltsiumi, fosforit, triglütseriide, mis on määratud enne sööki, teatavaid hormone, methemoglobiini ja koliinesteraasi. Need on vaja määrata teatavatesse klassidesse kuuluvate ainete puhul või konkreetsete juhtude põhised.

⁽¹⁾ Mitmete seerumi ja plasma, peamiselt glükoosi mõõtmiste korral ei tohiks loomadele eelneva öö jooksul toitu anda. Selle peamiseks põhjuseks on see, et toidu andmise korral oleks tulemuste varieeruvus suurem ning see varjaks raskemini tuvastatava toime ning muudaks tõlgendamise raskeks. Teisest küljest võib see aga häirida loomade tavapärase üldist ainevahetust ja eelkõige toitumisuuringute puhul võib see häirida igapäevaseid kokkupuuteid uuritava ainega. Kui loomadele ei anta öö jooksul toitu, tuleks uuringu neljandal nädalal tehtud funktsionaalsete vaatluste järel teha kliinilis-biokeemilised määramised

▼B

Üldiselt on vaja paindlikku lähenemisviisi, mis sõltub vastava aine liigist ja selle täheldatud ja/või oodatud toimest.

Kui varasemad lähteandmed ei ole piisavad, tuleks enne doseerimise alustamist määrata hematoloogilised ja kliinilis-biokeemilised muutujad; tavaliselt ei soovitata neid andmeid hankida enne menetlust (7).

1.5.2.3. *Täielik lahang*

Kõik uuringusse kaasatud loomad läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki haavu, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisu. Kõikide loomade (välja arvatud need, kes leitakse surevatena ja/või tapetakse uuringu ajal) maks, neerud, neerupealsed, munandid, munandimanused, emakas, munasarjad, harknääre, põrn, aju ja süda tuleb vajaduse korral puhastada muudest kudedest ja nende märgmass määratakse kuivamise vältimiseks võimalikult kiiresti pärast dissekteerimist.

Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu seisukohast kõige sobivamas fiksaatoris: kõik silmaga täheldatavad vigastused, aju (olulised piirkonnad, sealhulgas suuraju, väikeaju ja medulla/ajusild), seljaaju (kolmel tasandil: tservikaalne, poolrindmik, lumbaarne), ajuripats, kilpnääre, kõrvalkilpnääre, harknääre, söögitoru, süljenäärmed, magu, peen- ja jämesool (sealhulgas Peyeri naastud), maks, kõhunääre, neerud, neerupealsed, põrn, süda, trahhea ja kopsud (mis puhutakse kõigepealt säilitusainet täis ja seejärel sukeldatakse sinna), aort, sugunäärmed, emakas, lisasugurõõrad, emaste rinnanäärmed, eesnääre, kusepõis, sapipõis (hiir), lümfisõlmed (eelistatult üks lümfisõlm, mis hõlmab manustamiskohta, ja teine lümfisõlm, mis on manustamiskohast eemal, et anda teavet süsteemse toime kohta), perifeerne närv (istmiku- või sääreluu närv), mis on eelistatult lihase lähedal, ning osa luuüdi (või alternatiivselt väike kogus toorest luuüdi), nahk ja silmad (kui oftalmoloogilise läbivaatuse käigus avastati muutusi). Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka teisi kudesid. Säilitada tuleks ka teised organid, mis on uuritava aine teadaolevatest omadustest tulevalt tõenäoliselt sihtorganid.

1.5.2.4. *Histopatoloogia*

Kõikide võrdlusrühma ja kõrge doosiga rühmade loomade säilitatud organeid ja kudesid tuleks histopatoloogiliselt põhjalikult uurida. Histopatoloogilised uuringud tuleks läbi viia ka teiste doosirühmade loomade puhul juhul, kui kõrge doosiga rühma osas tuvastatakse manustamisega seotud muutusi.

Uurida tuleks kõiki silmaga täheldatavaid kahjustusi.

Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks histopatoloogiline uuringteha nende kudede ja organite puhul, millel esineb samasugune toime kui katserühma puhul.

▼B**2. ANDMED JA ARUANDLUS****2.1. ANDMED**

Loomade kohta tuleks esitada andmed individuaalselt. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, katse ajal surnud või humaansetel põhjustel tapetud loomade arv, toksiliste märkidega loomade arv, täheldatud toksiliste märkide kirjeldus, sealhulgas toksilise toime ilmumine, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik ja iga liiki kahjustuse kohta loomade protsent, kellele neid esines.

Kui võimalik, tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohaste ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Statistiliste meetodite ja analüüsitava andmete valik tuleks teha uuringu kavandamisel.

2.2. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab võimaluse korral sisaldama järgmist teavet.

2.2.1. Uuritav aine:

- füüsikaline loomus, puhtus ning füüsikalise-keemilised omadused;
- identifitseerimisandmed;
- vehiikel (vajaduse korral): vehiikeli valiku põhjendamine, kui vehiikeliks ei ole vesi.

2.2.2. Katseloomade liigid:

- liik ja kasutatav liin;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, toit jne;
- iga looma kaal katse alguses.

2.2.3. Katsetingimused:

- doositase valimise põhjendus;
- üksikasjad uuritava aine koostise/toiduvalmistise kohta, valmistises saavutatud kontsentratsiooni, stabiilsuse ja homogeensuse kohta;
- uuritava aine manustamise üksikasjad;
- tegelikud doosid (mg kehakaalu kg kohta päevas) ja vajaduse korral ümberarvestustegur toidu/joogivee uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) ja tegeliku doosi vahel;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad.

2.2.4. Tulemused:

- eluskaal ja muutused eluskaalus;
- toidu ja vajaduse korral vee tarbimine;
- toksilise reaktsiooni andmed vastavalt looma soole ja doositasele, sealhulgas toksilisuse märgid;

▼B

- kliiniliste vaatluste iseloom, raskusaste ja kestus (pöördumatu või mitte);
- oftalmoloogilise läbivaatuse tulemused;
- sensoorse aktiivsuse, haardetugevuse ja motoorse tegevuse hindamine (kui võimalik);
- hematoloogilised katsed ja vastavate põhijoonte väärtused;
- kliinilise biokeemia katsed ja vastavate põhijoonte väärtused;
- lõplik kehakaal, organite kaal ja organite/kehakaalu suhted;
- lahkamise tulemused;
- histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- võimaluse korral andmed imendumise kohta;
- vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

3.

VIITED

- 1) IPCS (1986). Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. Environmental Health Criteria Document No 60.
- 2) Tupper, D. E., Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, pp. 999–1003.
- 3) Gad, S. C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, pp. 691–704.
- 4) Moser, V. C, Mc Daniel, K. M., Phillips, P. M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 108, pp. 267–283.
- 5) Meyer O. A., Tilson H. A., Byrd W. C, Riley M. T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore-and Hind- limb grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, pp. 233–236.
- 6) Crofton K. M., Howard J. L., Moser V. C, Gill M. W, Reiter L. W, Tilson H. A, MacPhail R. C. (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, pp. 599–609.
- 7) Weingand K., Brown G., Hall R. et al. (1996). „Harmonisation of Animal Clinic Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies”, *Fundam. & Appl. Toxicol.*, 29, pp. 198–201.

▼B**B.27. SUBKROONILISE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE – SUUKAUDSE KORDUSDOOSI TOKSILISUSE 90PÄEVANE UURING MITTENÄRILISTEL****1. MEETOD**

See subkroonilise suukaudse toksilisuse uurimismeetod lähtub juhendist OECD TG 409 (1998).

1.1. SISSEJUHATUS

Kemikaali toksiliste omaduste kindlaksmääramisel ja hindamisel võib teha subkroonilise suukaudse toksilisuse katseid, kasutades kordusdoose pärast seda, kui on saadud esialgne teave toksilisuse kohta akuutsetest või 28päevastest kordusdoosidega toksilisuse katsetest. 90päevane uuring annab teavet võimalike terviseriskide kohta, mis võivad tõenäoliselt tekkida korduva kokkupuute korral kiire kasvuperioodi jooksul kuni nooremisse täisikka arenemiseni. Uuring annab teavet toksilisuse peamiste mõjude kohta, tuvastab sihtorganid ja akumulatsioonivõimaluse ja võib anda katsealustele organismidele täheldatavat toimet mitteavaldava kontsentratsiooni väärtuse, mida saab kasutada doositasemete valimisel krooniliste mõjude uurimisel ja ohutuskaalutluste väljatöötamisel kokkupuutel inimestega.

Käesolev uurimismeetod võimaldab kindlaks määrata keemilise ainega kokkupuute ebasoodsaid mõjusid mittenäriliste liikidel ja seda tuleks kasutada ainult siis,

- kui teistes uuringutes täheldatud mõjud viitavad vajadusele saada selgust või iseloomustust teise, mittenäriliste liigi kohta või
- kui toksikokineetilised uuringud viitavad sellele, et konkreetse mittenäriliste liigist laboratooriumiloomade kasutamine on parim valik, või
- kui mõni muu konkreetne põhjus õigustab mittenäriliste liigi kasutamist.

Vt ka üldise sissejuhatus B osa.

1.2. MÕISTED

Doos – uuritava aine manustatav kogus. Doosi väljendatakse massina (g, mg) või uuritava aine massina katsealuse looma kaaluühiku kohta (nt mg/kg) või toidus oleva püsikontsentratsioonina (ppm).

Doseerimine – üldmõiste, mis hõlmab doosi, selle sagedust ja doseerimise kestust.

NOAEL – lühend sõnadest „no observed adverse effect level” ehk dooside kõige kõrgem tase, mis vastab katseorganismidele täheldatavat toimet mitteavaldavale sisaldusele.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritav aine manustatakse erinevatele katseloomade rühmadele suu kaudu kord päevas astmeliselt suureneva koguse kaupa selliselt, et üks rühm saaks 90 päeva jooksul ainult ühte doosi. Manustamisperioodi jooksul vaadeldakse loomi põhjalikult toksilisuse märkide tuvastamiseks. Katse ajal surnud või tapetud loomad lahatakse ning katse lõppemisel tapetakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

▼B

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. Loomaliigi valik

Tavaliselt kasutatav mittenäriliste liik on koerad, kelle tõug peaks olema täpselt määratletud; sageli kasutatakse jänesekoeri. Kasutada võib ka teisi liike, nt sigu ja minisigu. Esikloomaliste kasutamine ei ole soovitatud ja nende kasutamist tuleb põhjendada. Kasutada tuleks noori, terveid loomi ja koerte puhul võiks doseerimine eelistatavalt alata 4-6 kuu aga mitte hiljem kui üheksa kuu vanuselt. Kui uuring tehakse eeluuringuna pikaajalise kroonilise toksilisuse uuringu raames, tuleks mõlemas uuringus kasutada sama liiki/tõugu loomi.

1.4.2. Loomade ettevalmistamine

Kasutada tuleks terveid noori loomi, kes on aklimatiseerunud laboratooriumi tingimustega ning keda ei ole varem uuringus kasutatud. Aklimatiseerumise kestus sõltub valitud katselooma liigist ja päritolust. Selle kestuseks soovitatakse vähemalt viis päeva koertele või vastaval eesmärgil kohapeal kasvatatavatele sigadele ja vähemalt kaks nädalat kõnealustele loomadele, kui need on pärit väljastpoolt laboratooriumi. Katseloomad tuleks kirjeldada vastavalt nende liigile, liinile, päritolule, soole, kaalule ja/või vanusele. Loomad tuleks juhuslikult paigutada kontroll- ja katsesuhmadesse. Puurid tuleks asetada nii, et puuri ümberasetamisega seotud võimalikud mõjud oleks minimaalsed. Igale loomale peab määrama unikaalse identifitseerimisnumbri.

1.4.3. Dooside ettevalmistamine

Uuritavat ainet võib manustada söögi või joogiveega, sundsöötmisega või kapslitenä. Suukaudse manustamise meetod sõltub uuringu eesmärgist ja uuritava aine füüsikalise-keemilistest omadustest.

Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav aine sobivas vehiikelis. Soovitatakse, et võimaluse korral tuleks kõigepealt kasutada vesilahust/suspensiooni, seejärel õlilahust/emulsiooni (nt maisiõli) ja siis lahustamist teistes vehiikelites. Mittevesilahuseliste vehiikelite puhul peab teadma vehiikeli toksilisi omadusi. Kindlaks tuleks määrata uuritava aine püsivus manustamise tingimustes.

1.5. KATSE KÄIK

1.5.1. Loomade arv ja sugu

Iga doositase juures tuleks kasutada vähemalt kaheksat looma (nelja emast ja nelja isast). Kui osa loomi on kavas katse käigus tappa, tuleks loomade arvu enne katse lõppu tapetavate loomade arvu võrra suurendada. Loomade arv uuringu lõpul peab olema piisav toksilise mõju adekvaatseks hindamiseks. Tuginedes eelnevatele teadmistele aine või selle lähedase analoogi kohta, tuleks kaaluda kaheksaloomalise (neli kummastki soost) satelliitühma lisamist kontrollühma ja suurima doosi rühma, et jälgida pärast manustamisperioodi lõppu mis tahes toksilise toime pööratavust või püsivust. Selle menetlusjärgse perioodi kestus tuleks dokumenteerida vastavalt täheldatud mõjudele.

▼B**1.5.2. Doseerimine**

Uurimuses tuleb kasutada vähemalt kolme doositaset ja ühel ajal uuringuga peab tegema ka kontrolli, välja arvatud piirsalduskatse tegemisel (vt 1.5.3). Doositasemed võivad põhineda kordusdoosi või vahemiku leidmise uuringu tulemustel ja peaksid arvesse võtma uuritava ühendi või sellega seotud materjalide kohta olemasolevat toksikoloogilist ja toksikokineetilist teavet. Kui uuritava aine füüsikaliskemilised omadused või bioloogiline mõju ei piira suurima doosi valimist, tuleb doositase valida nii, et sellega kaasneks mürgitus, kuid et see ei põhjustaks surma ega tõsiseid kannatusi. Doositasemed tuleks valida kahanevas järjekorras, eesmärgiga näidata iga doosiga seotud reaktsioonid ja katseorganismidele täheldatavat toimet mitteavaldav sisaldus (NOAEL) kõige madalamal doositasemel. Sageli on kõige optimaalsemad kahe- kuni neljakordsed erinevused alanevate doositasemete korral ja sageli on kasulikum lisada neljas katserühm, kui kasutatakse väga suuri vahesid dooside vahel (nt suuremaid kui 6–10kordseid).

Kontrollrühm peab olema rühm, millele ei manustata, või rühm, mis saab vehiikelit, kui uuritava aine manustamisel kasutatakse vehiikelit. Kontrollrühma loomi tuleb käidelda samal viisil kui katserühmade loomi, välja arvatud see, et neile ei anta uuritavat ainet. Kui kasutatakse vehiikelit, manustatakse kontrollrühmale vehiikelit suurimas kasutatavas ruumalas. Kui uuritavat ainet antakse koos toiduga ja see põhjustab toidu tarbimise vähenemist, võib paaristoidetav kontrollrühm olla kasulik selleks, et teha vahet maitsest või katsemudelisel aset leidnud toksikoloogilistest muutustest põhjustatud vähenemisel.

Vastavalt vajadusele tuleks arvesse võtta järgmiseid vehiikeli ja teiste lisandite omadusi: mõju uuritava aine imendumisele, jaotumisele, ainevahetusele või retentsioonile; mõju uuritava aine keemilistele omadustele, mis võivad muuta selle toksilisi omadusi; ja mõju loomade toidu või vee tarbimisele või nende toitumisseisundile.

1.5.3. Piirsalduskatse

Kui katse ühe doosi suurusega, mis on vähemalt 1 000 mg looma kehakaalu kg kohta ööpäevas, kasutades käesoleva uuringu jaoks kirjeldatud töökorda, ei põhjusta märgatavat ebasoodsat mõju ja kui toksilisust ei eeldata samalaadse struktuuriga ainete kohta käivate andmete põhjal, ei ole kolme doosi suurustega täisuuring vajalik. Teha võib piirsalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

1.5.4. Doseerimine

Loomadele doseeritakse uuritavat ainet seitsmel päeval nädalas ja 90 päeva jooksul. Mis tahes muu doseerimisrežiim, nt viis päeva nädalas, vajab põhjendamist. Kui uuritavat ainet manustatakse kunstlikult, peaks seda tegema loomadele ühe doosi kaupa, kasutades maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Maksimaalne vedeliku maht, mida võib korraga loomale manustada, sõltub katselooma suurusest. Tavaliselt tuleks hoida need mahud võimalikult madalal. Välja arvatud ärritavate või söövitavate ainete puhul, millel on suurematel kontsentratsioonidel tavaliselt halvem toime, tuleks katsemahu varieeruvus muuta minimaalseks sellega, et kõikidel doositasemetel kohandatakse ühesuguse mahu tagamiseks kontsentratsiooni.

▼B

Ainete puhul, mida manustatakse toidu või joogiveega, on oluline tagada, et toiduga kasutatavad uuritava aine kogused ei häiriks tavalist toitumise või joogivee tasakaalu. Kui uuritavat ainet manustatakse toiduga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni toidus (ppm) või püsiva suurusega doosi vastavalt looma kehakaalule; valitud alternatiiv tuleb täpsustada. Kui ainet manustatakse kunstlikult, tuleks doos anda igal päeval samal ajal ning seda tuleks vajaduse korral kohandada, et looma kehakaalu suhtes säiliks püsiv doositase. Kui 90päevane uuring tehakse eeluuringuna pikaajalise kroonilise toksilisuse uuringu raames, tuleks mõlemas uuringus kasutada samalaadset toitu.

1.5.5. **Vaatlused**

Vaatlusperiood peaks kestma vähemalt 90 päeva. Järeelvaatluse jaoks planeeritud satelliitühma loomad tuleks hoida sobiva perioodi jooksul menetlemata, et oleks võimalik avastada toksilise toime pööratavust või püsivust.

Vähemalt üks kord päevas tuleks teha üldine kliiniline läbivaatus, eelistatavalt igal päeval samal ajal/samadel aegadel, arvestades eeldatavat mõju kõrgperioodil pärast doseerimist. Loomade kliiniline seisund tuleks dokumenteerida. Vähemalt kaks korda päevas, tavaliselt iga päeva alguses ja lõpus, tuleks kontrollida, kas loomad on haigestunud või surnud.

Vähemalt üks kord enne esimest kokkupuudet (et võimaldada subjektide omavahelist kõrvutamist) ja pärast seda kord nädalas tuleks teha kõikide loomade üksikasjalik kliiniline läbivaatus. Kui see on praktiliselt võimalik, tuleks sellised vaatlused teha väljaspool puuri, selleks ettenähtud kohas ja eelistatavalt iga kord samal ajal. Tuleks üritada tagada, et vaatlustingimuste varieerumine oleks minimaalne. Toksilisuse nähud tuleks koos nende algusaja, raskusastme ja kestusega hoolikalt üles märkida. Vaatlus peaks sealhulgas sisaldama muutusi nahal, karvkattes, silmades, limaskestadel, sekretsiooni ja ekskretsiooni esinemises ja autonoomses tegevuses (nt pisaravool, karvade jäigastumine, pupilli suurus, ebatavaline hingamisrütm). Samuti tuleks üles märkida muutused käimises, seisangus ja samuti reageerimine käitlemisele ning klooniiliste või tooniliste liigutuste esinemine, stereotüübid (nt liigne karvade puhastamine, korduv tiirlemine) või igasugune kummaline käitumine.

Oftalmoloogiline läbivaatus, kasutades silmapeeglit või samalaadset sobivat vahendit, tuleks teha enne uuritava aine manustamist ja uuringu lõppedes eelistatavalt kõikidel loomadel, kuid vähemalt suure doosiga rühmas ja kontrollrühmas. Kui silmades avastatakse muutusi, tuleb läbi vaadata kõik loomad.

1.5.5.1. *Kehakaal ja toidu/vee tarbimine*

Kõiki loomi tuleks kaaluda vähemalt kord nädalas. Toidu tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat ainet manustatakse joogiveega, tuleb vee tarbimist samuti vähemalt kord nädalas mõõta. Vee tarbimise mõõtmist võib kaaluda ka selliste toitumis- või kunstlikult toitumise uuringute korral, mille jooksul võib joomisaktiivsuses esineda muutusi.

▼B1.5.5.2. *Hematoloogia ja kliiniline biokeemia*

Vereproovid tuleks võtta kindlaksmääratud kohast ja neid tuleks vajaduse korral säilitada sobivates tingimustes. Katseperioodi lõpus võetakse proovid vahetult enne loomade tapmist või selle käigus.

Katse alguses tuleks uurida hematoloogiat, sealhulgas hematokritti, hemoglobiini kontsentratsiooni, erütrotsüütide arvu, leukotsüütide üld- ja diferentseeritud arvu, vereliistakute arvu ja mõõta vere hüübimisvõimet, nagu näiteks hüübimise kiirust, protrombiiniaega või tromboplastiiniaega, seejärel kas kord iga kuu või katseperioodi keskel ja lõpuks katseperioodi lõpus.

Kliinilise biokeemia analüüsid, millega uuritakse kõige tähtsamaid mürgi mõjusid kudedes ja eriti selle mõju neerule ja maksale, tuleks teha vereproovide kohta, mis on võetud kõikidelt loomadelt katse alguses, seejärel kas kord iga kuu või katseperioodi keskel ja lõpuks katseperioodi lõpus. Vaatluse alla tuleks võtta sellised uuringuvaldkonnad nagu elektrolüütide tasakaal, sahhariidide ainevahetus ja maksa ning neeru funktsioon. Konkreetsete katsete valikut mõjutavad tähelepanekud uuritava aine mõju kohta. Sõltuvalt liigist ei tohiks loomadele enne vereproovide võtmist teatud aja vältel süüa anda. Soovitavad analüüsid on kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, paastumise glükoos,alaniinaminotransferaas, aspartaaminiotransferaas, orniitindekarboksülaas, gamma-glutamüültranspeptidaas, karbamiidlämmastik, albumiin, vere kreatiniin, kogu bilirubiin ja kogu seeriumi valgu mõõtmised.

Uriinianalüüsi peaks tegema vähemalt uuringu alguses, keskel ja lõpus, kasutades uriini kogumist kindlatel aegadel. Uriinianalüüsi puhul määratakse välimus, ruumala, osmolaalsus või erikaal, pH, valk, glükoos ja veri ja/või vererakud. Vajadusel võib kasutada lisapareetreid, kui on tarvis laiendada tähtsatud mõju uurimist.

Lisaks tuleks kaaluda üldisele kudedele kahjustusele osutavate markerite uurimist. Muud analüüsid, mis võivad osutada vajalikuks adekvaatse toksikoloogilise hindamise saamiseks, hõlmavad lipiidide, hormoonide, happe-aluse tasakaalu, methemoglobiini ja kolinesteraasi pärssimise analüüsi. Vajadusel võib kasutada täiendavaid kliinilise biokeemia valdkonda kuuluvaid uuringuid, kui on tarvis laiendada tähtsatud mõju uurimist. Need tuleb kindlaks määrata teatud klassi kuuluvate kemikaalide puhul või iga juhtumi puhul eraldi.

Üldiselt on vaja paindlikku lähenemist, mis sõltub liigist ja antud aine tähtsatud ja/või eeldatavast mõjust.

1.5.5.3. *Täielik lahang*

Kõik uuringusse kaasatud loomad läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki haavu, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisu. Kõikide loomade (välja arvatud need, kes leitakse surevatena ja/või tapetakse uuringu ajal) maks koos sapipõiega, neerud, neerupealsed, munandid, munandimannused, munasarjad, emakas, kilpnäär (koos kõrvalkilpnäärmetega), harknäär, põrn, aju ja süda tuleb vajaduse korral puhastada muudest kudedest ja nende märgmass tuleks fikseerida võimalikult kohe pärast nende eemaldamist, et vältida kuivamist.

▼B

Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu seisukohast kõige sobivamas fiksaatoris: kõik silmaga täheldatavad vigastused, aju (olulised piirkonnad, sealhulgas suuraju, väikeaju ja medulla/ajusild), seljaaju (kolmel tasandil: tservikaalne, poolrindmik, lumbarne), ajuripats, silmad, kilpnääre, kõrvakilpnääre, harknääre, söögitoru, siljenäärmed, magu, peen- ja jämesool (sealhulgas Peyeri naastud), maks, sapipõis kõhunääre, neerud, neerupealsed, põrn, süda, trahhea ja kopsud, aort, sugunäärmed, emakas, lisaorganid, emaste rinnanäärmed, eesnääre, kusepõis, lümfisõlmed (eelistatavalt üks lümfisõlm, mis paikneb manustamise teel, ja teine, mis asub manustamise teest kaugel ja näitab süsteemset mõju), perifeerne närv (istmik või sääreluu), eelistatavalt vastava lihase läheduses olev, luuüdi proov (ja/või värske luuüdi aspiraati) ja nahk. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka teisi kudesid. Säilitada tuleks ka teised organid, mis on uuritava aine teadaolevatest omadustest tulenevalt tõenäoliselt sihtorganid.

1.5.5.4. *Histopatoloogia*

Kõikide võrdlusrühma ja kõrge doosiga rühmade loomade säilitatud organeid ja kudesid tuleks histopatoloogiliselt põhjalikult uurida. See uuring tuleks läbi viia ka teiste doosirühmade loomade puhul juhul, kui kõrge doosiga rühma osas tuvastatakse manustamisega seotud muudatusi.

Uurida tuleks kõiki silmaga täheldatavaid kahjustusi.

Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks histopatoloogiline uuring teha nende kudede ja organite puhul, millel esineb samasugune toime kui katserühma puhul.

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**2.1. **ANDMED**

Loomade kohta tuleks esitada andmed individuaalselt. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, katse ajal surnud või humaansetel põhjustel tapetud loomade arv, toksiliste märkidega loomade arv, täheldatud toksiliste märkide kirjeldus, sealhulgas toksilise toime ilmnemine, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik ja iga liiki kahjustuse kohta loomade protsent, kellel neid esines.

Võimaluse korral tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohase ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Statistilised meetodid ja analüüsitavad andmed tuleks valida uuringu kavandamise etapis.

2.2. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

▼B

- 2.2.1. **Uuritav aine:**
- füüsikaline loomus, puhtus ning füüsikalis-keemilised omadused;
 - identifitseerimisandmed;
 - vehiikel (vajaduse korral): vehiikeli valiku põhjendus, kui vehiikeliks ei ole vesi.
- 2.2.2. **Katseloomade liigid:**
- liik ja kasutatav liin;
 - loomade arv, vanus ja sugu;
 - päritolu, pidamistingimused, toit jne;
 - iga looma kaal katse alguses.
- 2.2.3. **Katsetingimused:**
- doositaseme valimise põhjendus;
 - üksikasjad uuritava aine koostise/toiduvalmistise kohta, valmistises saavutatud kontsentratsiooni, stabiilsuse ja homogeensuse kohta;
 - uuritava aine manustamise üksikasjad;
 - tegelikud doosid (mg kehakaalu kg kohta päevas) ja vajaduse korral ümberarvestustegur toidu/joogivee uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) ja tegeliku doosi vahel;
 - toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad.
- 2.2.4. **Tulemused**
- eluskaal/muutused eluskaalus;
 - toidu ja vajaduse korral vee tarbimine;
 - toksilise reaktsiooni andmed vastavalt looma soole ja doositasemele, sealhulgas toksilisuse märgid;
 - kliiniliste vaatluste iseloom, raskusaste ja kestus (pöördumatu või mitte);
 - oftalmoloogiline läbivaatus;
 - hematoloogilised katsed ja vastavate põhijoonte väärtused;
 - kliinilise biokeemia katsed ja vastavate põhijoonte väärtused;
 - lõplik kehakaal, organite kaal ja organite kaalu/kehakaalu suhted;
 - lahkamise tulemused;
 - histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
 - vajaduse korral tulemuste
 - statistiline töötlemine.
- Tulemuste arutelu.
- Järeldused.

▼B**B.28. SUBKROONILISE TOKSILISUSE TEST NAHAKAUDSEL MANUSTAMISEL – 90PÄEVANE KORDUVANNUSTE NAHAKAUDSE MANUSTAMISE UURING NÄRILISTE LIIKIDEL****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatus.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatus.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

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

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Puuduvad.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS**1.6.1. Ettevalmistused**

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

1.6.2. Katsetingimused**1.6.2.1. Katseloomad**

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

▼B

1.6.2.2. Arv ja sugu

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

1.6.2.3. Annused

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

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

1.6.3. Piirsisalduskatse

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

1.6.4. Jälgimisaeg

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

▼B

1.6.5. Protseduur

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

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

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

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

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

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

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

- a) oftalmoloogiline uuring tuleks teha oftalmoskoobi või sobiva samaväärse vahendi abil enne kokkupuudet uuritava ainega ja uuringu lõppedes kõigile loomadele, kuid kindlasti suuri annuseid saanud ja kontrollrühma kuulunud loomadele. Kui leitakse muutusi silmades, tuleks uurida kõiki loomi;
- b) katse lõpus tuleks uurida hematoloogilisi näitajaid, sealhulgas hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide absoluutarv ja valem ning vere hüübimisnäitajaid, nagu näiteks hüübimisaeg, protrombiini aeg, tromboplastiini aeg või trombotsüütide arv;

▼B

- c) kliinilise biokeemia näitajaid tuleb määrata uuringuperioodi lõpus. Kõikide uuringute puhul sobivate analüüsides hulka kuuluvad elektrolüütide tasakaalu, süsivesikute metabolismi, maksa- ja neerufunktsiooni kajastavad näitajad. Spetsiifiliste testide valik sõltub vaatlusandmetest uuritava aine toimeviisi kohta. Soovitavad analüüsid on: kaltsium, fosfor, kloriid, naatrium, kaalium, tühja kõhu glükoos (liigile kohase näljaperioodiga), seerumi glutamaatpüruvaadi transaminaas, ⁽¹⁾ seerumi glutamaatoksaloatsetaadi transami-naas, ⁽²⁾ ornitiini dekarboksülaas, gammaglutamüültranspeptidaas, urea lämmastik, albumiin, seerumi kreatiiniin, üldbilirubiin ja üldvalk. Toksilisuse adekvaatseks hindamiseks võib olla vajalik määrata järgmisi näitajaid: lipiidid, hormoonid, hape-alus tasakaal, methemoglobiin ja koliinesteraasi aktiivsus. Kui ilmnenud toimeid on vaja põhjalikumalt uurida, võib kasutada veel teisigi kliinilise biokeemia analüüse;
- d) uriinianalüüsi ei ole vaja teha rutiinselt, vaid ainult juhul, kui see on näidustatud oodatava või ilmnenud toksilisuse tõttu.

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

L a h a n g

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

Histopatoloogiline uuring

- a) Täielik histopatoloogiline uuring tuleb teha kontrollrühma või suuri annuseid saanud rühma kuulunud loomade normaalsest ja ravitud nahast ja organitest ja kudedest.
- b) Uurida tuleb kõiki silmaga nähtavaid lesioone.

⁽¹⁾ Praegu tuntud kui aspartaadi aminotransferaas.

⁽²⁾ Praegu tuntud kuialaniini aminotransferaas.

▼B

- c) Teiste annustega rühmades tuleb uurida sihtorganeid.
- d) Kui kasutatakse rotte, tuleks väikese ja keskmise annuse rühmadesse kuuluvatel loomadel teostada kopsude histopatoloogilised uuringud infektsioonitunnuste suhtes, sest sel viisil on mugav hinnata loomade tervislikku seisundit. Edasisi histopatoloogilisi uuringuid ei pruugi nendes rühmadesse kuuluvatel loomadel rutiinselt vaja olla, kuid need tuleb igal juhul teostada organitel, kus suurte annuste kasutamisel täheldati lesioonide teket.
- e) Kui kasutatakse satelliitrühma, tuleks histopatoloogilised uuringud teha nendel organitel, mis ravi saanutel kahjustusid.

2. **ANDMED**

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

3. **ARUANDLUS**

3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

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

▼B

- histopatoloogiliste leidude detailne kirjeldus;
- tulemuste statistiline analüüs, kui see on võimalik;
- tulemuste arutelu;
- tulemuste tõlgendamine.

3.2. HINNANG JA TÕLGENDAMINE

Vt B osa üldist sissejuhatust.

4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

▼ **M4****B.29. SUBKROONILINE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL: 90-PÄEVANE UURING****KOKKUVÕTE**

Käesolev läbivaadatud katsemeetod B.29 on koostatud uuritava kemikaali mürgisuse täielikuks iseloomustamiseks sissehingamisel subkroonilise ajavahemiku vältel (90 päeva) ning usaldusväärsete andmete saamiseks, et kvantitatiivselt hinnata sissehingamise riski. Kümnest isas- ja kümnest emasloomast koosnevad närilisterühmad viiakse 90 päeva (13 nädala) jooksul kuus tundi päevas kokkupuutesse a) uuritava kemikaaliga kolmel või enamal kontsentratsioonil, b) filtritud õhuga (negatiivne kontrollgrupp) ja/või c) kandeainega (kandaine kontrollrühm). Loomade kokkupuude toimub üldjuhul viiel päeval nädalas, aga lubatud on ka kokkupuude seitsmel päeval nädalas. Alati katsetatakse nii isas- kui ka emasloomi, aga neid võidakse viia kokkupuutesse erinevate kontsentratsioonidega, kui on teada, et üks sugu on konkreetse uuritava kemikaali suhtes tundlikum. See meetod võimaldab uuringu juhile paindlikkust kaasata satelliitrühmad (pöörduvuse rühmad), surmata vahepeal loomi, teha bronhoalveolaarset lavaaži (BAL), neuroloogiakatseid ning täiendavaid kliinilise patoloogia ja histopatoloogia alaseid hindamisi, et uuritava kemikaali mürgisust paremini iseloomustada.

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 413 (2009). Algne sissehingamisel avalduvat subkroonilist mürgisust käsitlev katsejuhend (katsejuhend nr 413) võeti vastu 1981. aastal (1). Käesolev katsemeetod B.29 (mis on samaväärne katsejuhendi nr 413 läbivaadatud versiooniga (2009)) on ajakohastatud, et võtta arvesse teaduse taset ning rahuldada praegusi ja tulevase regulatiivseid vajadusi.
2. Sissehingamisel subkroonilise mürgisuse uuringuid kasutatakse peamiselt töökeskkonnas töötajate jaoks tekkiva riski hindamiseks, et õigusaktidega kehtestada lubatud kontsentratsioonid. Neid kasutatakse samuti inimeste elamute ja transpordiga seotud riskide ja keskkonnamiski hindamiseks. Käesolev meetod võimaldab iseloomustada uuritava kemikaali sissehingamisega toimival korduval igapäevasel kokkupuutel 90 päeva jooksul (ligikaudu 10 % roti elueast) avaldatavat kahjulikku mõju. Sissehingamisel subkroonilise mürgisuse uuringute andmeid saab kasutada kvantitatiivseks riski hindamiseks ja kroonilise mõju uuringute jaoks kontsentratsioonide valimiseks. Käesolev katsemeetod ei ole spetsiaalselt ette nähtud nanomaterjalide katsetamiseks. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud selle peatüki lõpus ja juhenddokumendis nr 39 (2).

LÄHTEKAALUTLUSED

3. Enne käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemist peaks uurimislabor läbi vaatama kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, et parandada uuringu kvaliteeti ja minimeerida loomade kasutamist. Teave, mis aitab valida katseks sobivad uuritavad kontsentratsioonid, hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalise-keemilised omadused; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed ja toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuriga ainete kohta ning muude korduva kokkupuute uuringutega saadud andmed. Kui uuringu puhul eeldatakse neurotoksilisust või täheldatakse uuringus selle olemasolu, võib uuringu juht otsustada teha sellekohased hindamised, näiteks funktsionaalsed vaatluskatsed (*functional observational battery*, FOB) ja motoorse aktiivsuse mõõtmise. Kuiigi konkreetsete hindamiste jaoks kokkupuute korraldamise ajastus võib olla kriitilise tähtsusega, ei tohiks kõnealused täiendavad uuringud põhiuuringu kava elluviimist segada.

▼ **M4**

4. Söövitava või ärritava uuritava kemikaali lahjendatud lahuseid võib katsetada kontsentratsioonil, mis annab soovitud mürgisuse määra. Lisateave on avaldatud juhenddokumendis nr 39 (2). Loomade kokkupuutesse viimisel kõnealuste materjalidega peaks sihtkontsentratsioon olema piisavalt väike, et see ei põhjustaks märkimisväärset valu ega kannatusi, kuid piisav, et pikendada kontsentratsiooni-mõju kõver tasemeni, millega saavutatakse katse regulatiivne ja teaduslik eesmärk. Kõnealused kontsentratsioonid tuleks valida juhtumipõhiselt, eelistatavalt asjakohaselt koostatud doosipiirkonna määramise katse alusel, millega saadakse teavet kõige olulisema näitaja, ärrituse ilmumise läviväärtuse ja aja kohta (vt punktid 11–13). Tuleks esitada kontsentratsiooni valimise põhjendus.
5. Suremas olevad loomad ja loomad, kes ilmselgelt kannatavad valu või kellel ilmnevad tõsiste või kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaansel viisil surmata. Suremas olevaid loomi võetakse katsetulemuste tõlgendamisel arvesse samamoodi kui katse käigus surnud loomi. Kriteeriumid, mille põhjal tehakse suremas oleva või raskelt kannatava looma surmamise otsus, ja juhised prognoositava või läheneva surma kindlakstegemiseks on esitatud humaansed lõpetamiskriteeriume käsitlevas OECD juhenddokumendis (3).

MEETODI KIRJELDUS**Loomaliigi valimine**

6. Kasutatakse enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi. Eelistatud liigiks on rott. Muu liigi kasutamise korral tuleks seda põhjendada.

Loomade ettevalmistamine

7. Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Randomiseerimise päeval peaksid loomad olema seitsme kuni üheksa nädala vanused noored täiskasvanud. Kehamass ei tohiks erineda rohkem kui $\pm 20\%$ samast soost loomade keskmisest kehamassist. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks ning hoitakse oma puuris vähemalt viis päeva enne katse algust, et võimaldada neil laboritingimustega kohaneda.

Pidamistingimused

8. Loomad peaksid olema individuaalselt märgistatud, eelistatult nahaaluse transponderiga, et hõlbustada vaatlusi ja vältida segiajamist. Katseloomade pidamise ruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuigi see ei pruugi olla võimalik, kui kandainena kasutatakse vett. Enne ja pärast kokkupuudet tuleks loomad tavaliselt paigutada soo ja kontsentratsiooni alusel rühmitatuna puuridesse, kuid loomade arv puuris ei tohiks segada iga looma täpset jälgimist ning peaks minimeerima loomade suremist kannibalismi ja võitlemise tõttu. Kui loomade kokkupuude toimub ainult nina kaudu, siis võib olla vajalik lasta neil hoiutorudega kohaneda. Hoiutorud ei tohiks põhjustada loomadele üleauruseid füüsilisi, soojusest või piiratud liikumisvõimest tingitud ebamugavusi. Loomade liikumise piiramine võib mõjutada füsioloogilisi näitajaid, näiteks kehatemperatuuri (hüpertermia) ja/või hingamise minutimahtu. Kui on kättesaadavad üldandmed, mille kohaselt kõnealused muutusi märkimisväärses ulatuses ei teki, ei ole eelnev hoiutoruga kohanemine vajalik. Kogu keha kaudu aerosooliga kokkupuutuvaid loomi tuleks kokkupuute ajal eraldi hoida, et vältida loomadepoolset uuritava aerosooli filtrimist läbi oma puurikaaslaste karvkatte. Võib kasutada tavalisi ja sertifitseeritud laborisöötasid, v.a kokkupuute ajal, ning anda piiramatus koguses kraanivett. Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.

▼ **M4****Inhalatsioonikambriid**

9. Inhalatsioonikambri valimisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali laadi ja katse eesmärki. Eelistatav kokkupuuteviis on ainult nina kaudu (mis hõlmab ainult pea, nina või koonu kaudu kokkupuudet). Ainult nina kaudu toimuvad kokkupuudet eelistatakse üldiselt vedelik- või pulberaerosooli ja aerosooliks kondenseeruda võiva auruga tehtavate uuringute puhul. Uuringu eesmärgi saavutamiseks võib parem olla kokkupuude kogu keha kaudu, kuid seda tuleks katseprotokollis põhjendada. Kogukehakambri kasutamise korral keskkonna stabiilsuse tagamiseks ei tohiks katseloomade kogumaht ületada 5 % kambri mahust. Ainult nina ja kogu keha kaudu kokkupuute tehnilisi põhimõtteid ning konkreetseid eeliseid ja puudujääke on kirjeldatud juhenddokumendis nr 39 (2).

TOKSILISUSE UURINGUD**Piirkontsentratsioonid**

10. Erinevalt ägeda mürgisuse uuringutest ei ole sissehingamisel avalduva subkroonilise mürgisuse uuringutel kindlaksmääratud piirkontsentratsioone. Maksimaalse katsetatava kontsentratsiooni valimisel tuleks arvesse võtta järgmist: 1) maksimaalne saavutatav kontsentratsioon, 2) millise kemikaali kontsentratsiooniga võib inimene kokku puutuda halvimal juhul, 3) vajadus säilitada piisav varustus hapnikuga ja/või 4) loomade heaolu kaalutlused. Kui andmetel põhinevad piirangud puuduvad, võib kasutada määruse (EÜ) nr 1272/2008 (13) ägeda mürgisuse piirmäärasid (st kuni kontsentratsioonini 5 mg/l aerosooli puhul, 20 mg/l auru puhul ja 20 000 ppm gaasi puhul), vt juhenddokument nr 39 (2). Kui kõnealune piirmäär tuleb gaasi või väga lenduva uuritava kemikaali (näiteks külmutusagens) katsetamisel ületada, tuleks seda põhjendada. Piirkontsentratsioonil peaks ilmnema üheselt mõistetav mürgisus, kuid see ei tohiks põhjustada loomadele liigset stressi ega lühendada nende elu (3).

Doosipiirkonna määramise katse

11. Enne põhiuuringu alustamist on tavaliselt vaja teha doosipiirkonna määramise katse. Doosipiirkonna määramise katse on eeluuringust põhjalikum, kuna selles ei piirdata kontsentratsiooni valimisega. Doosipiirkonna määramise katsest saadud teadmistest võib sõltuda põhiuuringu edukus. Doosipiirkonna määramise katsest võidakse näiteks saada tehnilist teavet analüüsimeetodite ja osakeste suuruse määramise kohta, teha kindlaks toksilisuse mehhanisme, saada kliinilise patoloogia ja histopatoloogia andmeid ning hinnata, milline võib põhiuuringus olla täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) ja minimaalne mürgine kontsentratsioon (MTC). Uuringu juht võib otsustada kasutada doosipiirkonna määramise katset, et määrata kindlaks hingamisteede ärrituse läviväärtus (näiteks hingamisteede histopatoloogia, kopsutalitluse katsete või bronhoalveolaarse lavaaži abil), maksimaalne kontsentratsioon, mille juures loomadele ei tekitata liigset stressi, ja uuritava kemikaali mürgisust kõige paremini iseloomustavad parameetrid.
12. Doosipiirkonna määramise katse võib hõlmata ühte või enam kontsentratsiooni. Olenevalt valitud näitajatest tuleks kokkupuude iga kontsentratsiooniga korraldada kolmele kuni kuuele isasloomale ja kolmele kuni kuuele emasloomale. Doosipiirkonna määramise katse peaks kestma vähemalt viis päeva ja üldjuhul mitte kauem kui 28 päeva. Põhiuuringu kontsentratsioonide valimise põhjendused tuleks esitada uuringuprotokollis. Põhiuuringu eesmärk on näidata mõju sõltuvust kontsentratsioonist eelduste kohaselt kõige tundlikuma näitaja alusel. Väike kontsentratsioon peaks ideaaljuhul olema täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon ja suur kontsentratsioon peaks näitama üheselt mõistetavat mürgistust, kuid see ei tohiks põhjustada loomadele liigset stressi või lühendada nende elu (3).

▼ **M4**

13. Doosipiirkonna määramise katse jaoks kontsentratsioonide valimisel tuleks arvesse võtta kogu saadaolevat teavet, sh struktuuri-aktiivsuse sõltuvusi ja samalaadseid kemikaale käsitlevaid andmeid (vt punkt 3). Doosipiirkonna määramise katse võib kinnitada mehhanistlike kriteeriumide alusel kõige tundlikumaks peetavaid näitajaid, nagu organofosfaatide põhjustatud kolliinesteraasi inhibeerimine, erütrotsütotoksiliste ainete põhjustatud methemoglobiini teke, türoidhormoonid (T_3 , T_4) türotoksikantide puhul, valk, laktaatdehüdrogenaas (LDH) või neutrofiilid bronhoalveolaarses lavaažis ohutute vähe lahustuvate osakeste või kopse ärritavate aerosoolide puhul, või need ümber lükata.

Põhiuuring

14. Subkroonilise mürgisuse põhiuuring hõlmab üldjuhul kolme kontsentratsiooni ning vajaduse korral samuti samaaegseid negatiivseid (õhu) ja/või kandeaiane kontrollrühmi (vt punkt 18). Asjakohaste kokkupuutetasemete valimisel tuleks kasutada kõiki kättesaadavaid andmeid, sh süsteemse mürgisuse uuringute, metaboliseerimise ja kineetika uuringute tulemusi (eriti tuleks tähelepanu pöörata suure kontsentratsiooni vältimisele, mille puhul kineetilised protsessid küllastatakse). Iga katserühm koosneb kümnest isas- ja kümnest emasloomast (närlised), kes viiakse uuritava kemikaaliga kokkupuutesse kuueks tunniks päevas viiel päeval nädalas 13 nädala vältel (uuringu kogukestus on vähemalt 90 päeva). Loomad võib viia kokkupuutesse ka seitsmel päeval nädalas (näiteks sissehingatavate ravimite katsetamisel). Kui üks sugu on teatava uuritava kemikaali suhtes teadaolevalt tundlikum, võib eri sugude puhul kasutada kokkupuutel erinevaid kontsentratsioone, et optimeerida mõju kontsentratsioonist sõltuvust, nagu on kirjeldatud punktis 15. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu närliseligi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Päevas vähem kui kuuetunnise kokkupuute kasutamisel või kui on vajalik korraldada pika kestusega (näiteks 22 tundi päevas) kogu keha kaudu kokkupuute uuring, tuleb seda põhjendada (vt juhenddokument nr 39 (2)). Loomi ei tohiks kokkupuute ajal sööta, v.a juhul, kui kokkupuuteperiood ületab kuut tundi. Kogu keha kaudu toimuva kokkupuute ajal võib loomadele anda vett.
15. Valitud sihtkontsentratsioonid peaksid võimaldama kindlaks teha sihtorgani(d) ja saada mõju selge sõltuvus kontsentratsioonist.
- Suur kontsentratsioon peaks põhjustama mürgist mõju, kuid ei tohiks põhjustada püsivaid nähte ega surma, mis takistaks usaldusväärset hindamist.
 - Keskmine (keskmised) kontsentratsioon(id) peaks(id) olema eraldatud, et esile kutsuda eri tugevusega mürgist mõju väikese ja suure kontsentratsiooni vahemikus.
 - Väike kontsentratsioon peaks põhjustama vähe mürgistusnähtusid või olema mõjuta.

Vahepealsed surmamised

16. Kui osa loomi kavandatakse surmata uuringu vältel, tuleks iga kokkupuutetaseme loomade arvu suurendada enne uuringu lõppu surmata plaanitud loomade arvu võrra. Tuleks esitada vahepealsete surmamiste kasutamise põhjendus ja statistilistes analüüsides tuleks neid asjakohaselt arvesse võtta.

▼ **M4****Satelliituuring (pöörduvuse uuring)**

17. Mürgistuse pöörduvuse, püsivuse või viivitusega avaldumise jälgimiseks võidakse korraldada satelliituuring (pöörduvuse uuring) töötlusjärgsel asjakohase pikkusega ajavahemikul, mis ei tohi olla lühem kui 14 päeva. Satelliitühmades (pöörduvuse rühmades) on kümme isas- ja kümme emaslooma, kellele korraldatakse kokkupuude põhiuuringu katseloomadega samal ajal. Satelliituuringu (pöörduvuse uuringu) rühmad peaksid uuritava kemikaaliga kokku puutuma suurimal kontsentratsioonil ning vajaduse korral tuleks kasutada samaaegseid õhu ja/või kandeaine kontrollrühmi (vt punkt 18).

Loomade kontrollrühm

18. Samaaegse negatiivse (õhu) kontrollrühma loomi tuleks kohelda katserühma loomadega samalaadsel viisil selle erinevusega, et nad viiakse uuritava kemikaali asemel kokkupuutesse filtritud õhuga. Kui katsekeskkonna loomisel kasutatakse vett või muud ainet, tuleks uuringus kasutada negatiivse (õhu) kontrollrühma asemel kandeaine kontrollrühma. Võimaluse korral tuleks kandeainena alati kasutada vett. Kui kandeainena kasutatakse vett, peaks loomade kontrollrühm puutuma kokku sama suhtelise õhuniiskusega õhuga kui katse käigus kokku puutuvad rühmad. Sobiva kandeaine valimine peaks põhinema asjakohasel eeluuringul või varasematel andmetel. Kui kandeaine mürgisus ei ole hästi teada, võib uuringu juht otsustada kasutada nii negatiivset (õhu) kontrollrühma kui ka kandeaine kontrollrühma, kuid see ei ole soovitatav. Kui varasematest andmetest nähtub, et kandeaine ei ole mürgine, ei ole negatiivset (õhu) kontrollrühma vaja ja tuleks kasutada ainult kandeaine kontrollrühma. Kui kandeaines oleva uuritava kemikaali eeluuringust mürgisust ei nähtu, siis võib järeldada, et kandeaine ei ole katsetataval kontsentratsioonil mürgine ja tuleks kasutada selle kandeaine kontrollrühma.

KOKKUPUUTETINGIMUSED**Kontsentratsioonide manustamine**

19. Loomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on gaas, aur, aerosool või nende segu. Katses kasutatav füüsikaline olek sõltub uuritava kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest, valitud kontsentratsioonist ja/või uuritava kemikaali kõige tõenäolisemast füüsikalisest vormist käsitsemise ja kasutamise ajal. Hügrokoopseid ja väga reaktsioonivõimelisi uuritavaid kemikaale tuleks katsetada kuiva õhu tingimustes. Tuleks olla ettevaatlik, et vältida plahvatusohtliku kontsentratsiooni tekkimist. Aineosakesi võib osakeste suuruse vähendamiseks mehaaniliselt töödelda. Täpsemad juhendid on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

Osakeste suurusjaotus

20. Osakeste suurusjaotus tuleks määrata kõigi aerosoolide puhul ja samuti aurude puhul, mis võivad kondenseeruda ja moodustada aerosooli. Hingamisteede kõigi asjakohaste piirkondadega kokkupuute võimaldamiseks soovitatakse kasutada aerosoole, mille osakeste massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) on vahemikus 1–3 µm ning geomeetriline standardhälve (σ_g) on 1,5–3,0 (4). Kõnealuse standardi järgimiseks tuleks teha mõistlikud jõupingutused; kui standardit ei ole võimalik järgida, tuleks esitada eksperdi hinnang. Näiteks metallisuitsu osakesed on kõnealusest normväärtusest väiksemad ning laenguga osakesed ja kiud võivad sätestatud näitajaid ületada.

▼ **M4****Uuritava kemikaali preparaat kandaines**

21. Ideaaljuhul tuleks uuritavat kemikaali katsetada ilma kandaineta. Kui kandaine kasutamine on vajalik sobiva uuritava kemikaali kontsentratsiooni ja osakeste suuruse tekitamiseks, tuleks eelistatavalt kasutada vett. Alati, kui uuritav kemikaal lahustatakse kandaines, tuleks tõendada uuritava kemikaali stabiilsust.

KOKKUPUUTETINGIMUSTE SEIRE**Kambri õhuvarustus**

22. Kokkupuutekambri õhuvarustust tuleks hoolikalt kontrollida, pidevalt seirata ning andmed iga kokkupuute korral vähemalt kord tunnis registreerida. Katsekeskkonna kontsentratsiooni (või ajalise stabiilsuse) reaajas seire on kõigi dünaamiliste parameetrite mõõtmisel tingimata vajalik ja kujutab endast kaudset vahendit sissehingamise kõigi asjakohaste dünaamiliste parameetrite kontrollimiseks. Kui kontsentratsiooni jälgitakse reaajas, võib õhuvoogude mõõtmise sageduse vähendada ühele mõõtmisele kokkupuute kohta päevas. Ainult nina kaudu kokkupuudet võimaldava kambri puhul tuleks eritähelpanu pöörata väljahingatud õhu uuesti sissehingamise vältimisele. Hapnikusisaldus peaks olema vähemalt 19 % ja süsinikdioksiidisisaldus ei tohiks ületada 1 %. Kui on alust arvata, et kõnealuseid norme ei ole võimalik täita, tuleks hapniku- ja süsinikdioksiidisisaldust mõõta. Kui kokkupuute esimese päeva mõõtmistest nähtub, et kõnealuste gaaside sisaldus on nõuetekohasel tasemel, ei peaks edasine mõõtmine olema vajalik.

Kambri temperatuur ja suhteline õhuniiskus

23. Kambri temperatuur tuleks hoida 22 ± 3 °C juures. Loomade hingamistsooni suhtelist õhuniiskust nii ainult nina kui ka kogu keha kaudu toimuva kokkupuute korral tuleks pidevalt seirata ja see tuleks registreerida võimaluse korral üks kord tunnis iga kokkupuute ajal. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatavalt hoida vahemikus 30–70 %, kuid uuritava kemikaali mõju tõttu ei pruugi see olla saavutatav (näiteks veepõhise segu uurimisel) või mõõdetav.

Uuritav kemikaal: nimikontsentratsioon

24. Kui see on võimalik, tuleks kokkupuutekambri nimikontsentratsioon alati arvutada ja registreerida. Nimikontsentratsioon on katsekeskkonda lisatud uuritava kemikaali mass, mis on jagatud läbi kambriüsteemi suunatud õhu kogumahuga. Nimikontsentratsiooni ei kasutata loomade kokkupuute iseloomustamiseks, kuid nimikontsentratsiooni võrdlus tegeliku kontsentratsiooniga näitab katsesüsteemi kemikaali lisamise tõhusust ning seega saab seda kasutada kemikaali lisamisel esinevate probleemide avastamiseks.

Uuritav kemikaal: tegelik kontsentratsioon

25. Tegelik kontsentratsioon on inhalatsioonikambri loomade hingamistsoonist võetud proovist määratud uuritava kemikaali kontsentratsioon. Tegelikke kontsentratsioone on võimalik saada kas spetsiifiliste meetodite abil (näiteks otsene proovivõtt, adsorptsiooni või keemilise reaktsiooni meetodid ning järgnev analüüsimine) või mittespetsiifiliste meetodite abil, näiteks filtrite gravimeetriline analüüs. Gravimeetrilise analüüsi kasutamine on lubatud ainult ühest koostisainest koosneva pulberaerosooli või vahelenduva vedeliku aerosooli korral ja see peaks olema enne katse tegemist kinnitatud

▼M4

konkreetsed kemikaali määramisega. Mitmest koostisainest koosneva pulberaerosooli kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks võib samuti kasutada gravimeetrilisi analüüsi. Sel juhul tuleb analüüsiga tõendada, et õhus oleva materjali koostis sarnaneb lähtematerjali koostisega. Kui selline teave ei ole kättesaadav, võib osutada vajalikuks teha uuringu vältel uuritava kemikaali (eelistatult lenduvas olekus) kordusanalüüsi korrapäraste ajavahemike järel. Aerosoolainete puhul, mis võivad aurustuda või sublimeeruda, tuleks näidata, et valitud meetodiga koguti kõiki faase.

26. Võimaluse korral tuleks kogu katse jooksul kasutada uuritava kemikaali ühte partiid ning uuritavat proovi tuleks säilitada tingimustes, milles säilib selle puhtus, homogeensus ja stabiilsus. Enne uuringu alustamist tuleks uuritavat kemikaali, sh selle puhtust, iseloomustada; kui see on tehniliselt võimalik, tuleb keemiliselt määratleda ka kindlakstehtud saasteained ja lisandid ning määrata nende kogused. Seda on võimalik tõendada muu hulgas järgmiste andmete alusel: retentsiooniaeg ja suhteline piigipindala, molekulmass massispektroskoopia või gaaskromatograafia analüüsides või muud hinnangud. Kuigi uurimislabor ei vastuta uuritava kemikaali proovi keemilise määramise eest, võib uurimislaboril olla mõttekas kinnitada tellija iseloomustust vähemalt piiratud ulatuses (näiteks värv, füüsikalised omadused jne).
27. Kokkupuutekeskkonda hoitakse võimaluste piires muutumatuna. Kokkupuute tingimuste stabiilsuse tõendamiseks võib kasutada reaajas seire seadet, näiteks aerosooli fotomeetrit aerosoolide puhul või süsivesinike kogusisalduse analüsaatorit aurude puhul. Tegelikku kambrikontsentratsiooni tuleks mõõta vähemalt kolm korda iga kokkupuutepäeva jooksul iga kokkupuutekontsentratsiooni kohta. Kui see piiratud õhuvarustuse või väikeste kontsentratsioonide tõttu ei ole võimalik, võib kogu kokkupuuteperioodi kohta võtta ühe proovi. Ideaaljuhul tuleks kõnealune proov võtta kogu kokkupuuteaja jooksul. Kambrist võetud proovide kontsentratsioon ei tohiks keskmisest kontsentratsioonist erineda rohkem kui $\pm 10\%$ gaaside ja aurude puhul või $\pm 20\%$ vedelik- või pulberaerosoolide korral. Tuleks arvutada kambri tasakaaluoleku saavutamise aeg (t_{95}) ja see registreerida. Kokkupuute ajavahemik kestab selle aja, kui uuritavat kemikaali lisatakse. Selles võetakse arvesse aega, mis on vajalik kambri tasakaaluseisundi saavutamiseks (t_{95}) ja kontsentratsiooni langemiseks. Juhendid t_{95} hindamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).
28. Väga keeruka segu puhul, mis koosneb gaasidest/aurudest ja aerosoolidest (näiteks põlemiskeskonnad ja uuritavad kemikaalid, mida paiskab välja mõni eriotstarbeline lõppkasutustoodet või -seade), võib iga faas käituda inhalatsioonikambri erinevalt. Seepärast tuleks valida vähemalt üks indikaatoraine (mida analüüsiga määratakse), tavaliselt sellise segu peamine toimeaine, iga faasi (gaas/aur ja aerosool) kohta. Kui uuritav kemikaal on segu, tuleks kirja panna kogu segu analüütiline kontsentratsioon ja mitte ainult toimeaine või komponendi (analüüsiga määratava aine) kontsentratsioon. Lisateave tegelike kontsentratsioonide kohta on juhenddokumendis nr 39 (2).

Uuritav kemikaal: osakeste suurusjaotus

29. Aerosooliosakeste suurusjaotus tuleks kindlaks määrata vähemalt iga nädal iga kontsentratsiooni kohta, kasutades kaskaadimpaktorit või alternatiivset seadet, näiteks aerodünaamilist osakeste suuruse määrajat. Kui on võimalik tõendada kaskaadimpaktori ja alternatiivse seadme abil saadud tulemuste võrdväärsust, võib kogu uuringu tegemiseks kasutada alternatiivset seadet.

▼ **M4**

30. Paralleelselt peamise seadmega tuleks kasutada muud seadet, näiteks gravimeetrilist filtrit või minitsüklonit või gaasipesukolbi, et veenduda peamise seadme kogumistõhususes. Osakeste suuruse analüüsi kaudu saadud massikontsentratsioon peaks mõistlikes piirides kokku langema filtrianalüüsi abil saadud massikontsentratsiooniga (vt juhenddokument nr 39 (2)). Kui uuringu varajases etapis on kõikidel uuritavatel kontsentratsioonidel võimalik tõendada võrdväarsust, võib täiendavatest kinnitavatest mõõtmistest loobuda. Loomade heaolu silmas pidades tuleks võtta meetmeid, et mitte saada katsest ebaselgeid andmeid, mille tõttu võib olla vajalik uuringut korrata.
31. Aurudega tuleks teha osakeste suurusjaotuse määramine sel juhul, kui on võimalik, et auru kondensatsiooni tõttu võib tekkida aerosool või kui auru keskkonnas tuvastatakse osakesi, mille puhul võib tegemist olla faaside seguga.

VAATLUSED

32. Loomi tuleks enne kokkupuuteperioodi, selle vältel ja pärast seda kliiniliselt jälgida. Olenevalt loomade reageerimisest kokkupuutele võidakse ette näha sagedasem jälgimine. Kui loomade jälgimist takistab looma hoiutoru, halvasti valgustatud kogukehakamber või läbipaistmatu keskkond, tuleks loomi hoolikalt jälgida pärast kokkupuudet. Enne järgmise päeva kokkupuudet toimuva jälgimise abil on võimalik hinnata mürgise mõju pöörduvust või süvenemist.
33. Kõik vaatlusandmed registreeritakse iga looma kohta eraldi. Kui loomad surmatakse humaansetel kaalutlustel või leitakse surmuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.
34. Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade, limaskestade, hingamis-, vereringe- ja närvisüsteemi muutusi, samuti somatomotoorse aktiivsuse ja käitumismustri muutusi. Tähelepanu peaks olema suunatud värinate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma kindlakstegemisele. Pärakutemperatuuri mõõtmine võib anda lisaandmeid refleksipõhise hingamise aeglustumise või hüpo-/hüpertermia kohta, mis on seotud kokkupuute või vangistusega. Uuringusse võib lisada täiendavaid hindamisi, nagu kineetika, bioseire, kopsutalitlus, kopsukudedesse kogunevate vähe lahustuvate materjalide püsivus ja käitumismuutused.

KEHAMASS

35. Iga looma kehamass tuleks registreerida natuke enne esimest kokkupuudet (päev 0) ja seejärel kaks korda nädalas (näiteks reedeti ja esmaspäeviti, et tõendada taastumist ilma kokkupuuteta nädalavahetuse jooksul, või pärast ajavahemikku, mis võimaldab süsteemse mürgisuse hindamist) ning pärast surma või eutanaasiat. Kui esimese nelja nädala jooksul nähtusid ei ilmne, võib ülejäänud uuringu vältel mõõta kehamassi kord nädalas. Satelliitrühma (pöörduvuse rühma) loomade (kui neid kasutatakse) kaalumist tuleks jätkata iga nädal kogu taastumisperioodi vältel. Uuringu lõpetamisel tuleks iga looma veidi enne surmamist kaaluda, et võimaldada organite ja kehamassi suhte täpset arvutamist.

SÖÖDA JA VEE TARBIMINE

36. Sööda tarbimist tuleks mõõta iga nädal. Samuti võib mõõta vee tarbimist.

▼ **M4**

KLIINILINE PATOLOOGIA

37. Kliinilise patoloogia hindamised tuleks teha igale loomale, sh kontrollrühma ja satelliitrühma (pöörduvuse rühma) loomadele, kui nad surmatakse. Kokkupuute lõpetamise ja vereproovide võtmise vaheline ajavahemik tuleks registreerida, eriti kui kõnealuse näitaja taastumine on kiire. Plasmast kiiresti kaduvate indikaatorainete (näiteks COHb, CHE ja MetHb) määramiseks tuleb proov võtta kohe pärast kokkupuute lõppu.
38. Tabelis 1 on loetletud kliinilised patoloogilised parameetrid, mida nõutakse üldjuhul kõigi toksikoloogiliste uuringute puhul. Uriinianalüüs ei ole alati vajalik; selle võib teha, kui seda oodatava või ilmnunud toksilisuse tõttu peetakse kasulikuks. Uuringu juht võib uuritava kemikaali mürgisuse paremaks iseloomustamiseks otsustada hinnata täiendavaid parameetreid (näiteks koliinesteraas, lipiidid, hormoonid, happe-aluse tasakaal, methemoglobiin või Heinzi kehakesed, kreatiinkinaas, müeloidi/erütroidi suhe, troponiinid, arteriaalse vere gaasid, laktaatdehüdrogenaas, sorbitooldehüdrogenaas, glutaamatdehüdrogenaas ja γ -glutamüül-transpeptidaas).

Tabel 1

Standardsed kliinilise patoloogia parameetrid

Hematoloogia	
Erütrotsüütide arv	Leukotsüütide koguarv
Hematokrit	Diferentseeritud leukotsüütide arv
Hemoglobiini kontsentratsioon	Trombotsüütide arv
Hemoglobiini keskmine kogus erütrotsüüdis (MCH)	Hüübimisvõime (valige üks):
Keskmine erütrotsüüdi maht (MCV)	— protrombiini aeg
Hemoglobiini keskmine kontsentratsioon erütrotsüüdis	— hüübimisaeg
Retikulotsüüdid	— osalise tromboplastiini aeg
Kliiniline keemia	
Glükoos (*)	Alaniinaminotransferaas
Üldkolesterool	Aspartaataminotransferaas
Triglütseriidid	Leeliseline fosfataas
Vere karbamiidlämmastik	Kaalium
Üldbilirubiin	Naatrium
Kreatiniin	Kaltsium
Üldvalk	Fosfor
Albumiin	Kloriid
Globuliin	
Uriinianalüüs (valikuline)	
Välimus (värvus ja hägusus)	Üldvalk
Kogus	Glükoos
Suhteline tihedus või osmolaalsus	Veri/vererakud
pH	

(*) Kuna pikaajaline nälgimine võib põhjustada glükoosi mõõtmistulemuste erinevust katserühma ja kontrollrühma loomade vahel, peaks uuringu juht otsustama, kas loomade söögita jätmine on asjakohane. Kui loomad jäetakse söögita, peaks ajavahemik olema vastav kasutatavale liigile; roti puhul võib see ajavahemik olla 16 tundi (nälgimine öö jooksul). Paastuglükoosi võib määrata pärast öist nälgimist viimasel kokkupuutenädalal või pärast öist nälgimist enne lahkamist (viimasel juhul määratakse paastuglükoos koos kõigi muude kliinilise patoloogia näitajatega).

▼ **M4**

39. Kui on tõendeid, et peamine kogunemise ja säilitamise piirkond on madalamad hingamisteed (s.o alveoolid), võib oletatava annuse-mõju seose parameetrite kvantitatiivseks hindamiseks kasutada bronho-alveolaarset lavaaži, keskendudes alveoliidile, kopsukoe põletikule ja fosfolipidoosile. See võimaldab asjakohaselt kontrollida alveolaarse kahjustuse puhul esinevat doosi-toime seost ning toime sõltuvust ajast. Bronhoalveolaarse lavaaži vedelikku võib analüüsida leukotsüütide üldarvu ja diferentseeritud leukotsüüdiarvude, üldvalgu ja laktaatdehüdrogenaasi määramiseks. Veel võib kaaluda lüsoosoomide kahjustust, fosfolipidoosi, fibroosi ning ärritus- või allergilist põletikku tõendavate näitajate määramist, selleks võib määrata ka põletikuaineid tsütokiine/kemokiine. Bronhoalveolaarse lavaaži mõõtmised üldiselt täiendavad histopatoloogiliste uuringute tulemusi, kuid ei saa neid asendada. Kopsude lavaaži tegemise juhendid on esitatud juhenddokumendis nr 39 (2).

OFTALMOLOOGILINE LÄBIVAATUS

40. Enne uuritava kemikaali manustamist tuleks kõikide loomade ning katse lõpetamisel kõikide suure kontsentratsiooni ja kontrollrühmade loomade puhul teha oftalmoskoobi või samaväärse seadme abil silmapõhja, valgust murdvate keskkondade, iirise ja sidekestade oftalmoloogilised uuringud. Kui silmas tuvastatakse muutusi, tuleks uurida kõiki muude rühmade (sh satelliitrühma (pöörduvuse rühma)) loomi.

MAKROPATOLOGIA JA ORGANITE MASS

41. Kõik katseloomad (kaasa arvatud katse käigus surnud, humaansel viisil surmatud või uuringust looma heaolu tagamiseks kõrvaldatud loomad) tuleks (võimaluse korral) täielikult veretustada ja täielikult lahata. Iga looma viimase kokkupuute lõpu ja surmamise vaheline ajavahemik tuleks registreerida. Kui lahkamine vahetult pärast surnud looma leidmist ei ole võimalik, tuleks loom jahutada (mitte külmutada) autolüüsi minimeerimiseks piisavalt madala temperatuurini. Lahata tuleks võimalikult kiiresti, tavaliselt ühe või kahe päeva jooksul. Iga looma kõik üldpatoloogilised muutused tuleks registreerida, pöörates eritähelpanu hingamisteede mis tahes muutustele.
42. Tabelis 2 on loetletud organid ja koed, mis täieliku lahkamise ajal tuleks sobivas keskkonnas säilitada histopatoloogia uuringu jaoks. [Nurksulgudes esitatud] organite ja kudede ning muude organite ja kudede säilitamise otsustab uuringu juht. **Paksus kirjas esitatud** organid tuleb välja puhastada ja kaaluda nii kiiresti kui võimalik, et vältida kuivamist. Kilpnääret ja munandimanuseid tuleks kaaluda ainult vajaduse korral, kuna nende väljapuhastamisel tekkivad moonutused võivad takistada histopatoloogilist hindamist. Koed ja organid tuleks paigutada 10 % puhverdatud formaliini või muusse sobivasse fikseerivasse ainesse vahetult pärast lahkamist ja mitte vähem kui 24–48 tundi enne väljapuhastamist, olenevalt kasutatavast fikseerivast aineist.

▼ **M4**

Tabel 2

Täieliku lahkamise juures säilitatavad organid ja koed

Neerupealised	Söögitoru
Aort	[Haistmissibul]
Luuüdi (ja/või värske aspiraat)	Munasarjad
Aju (sh suuraju osad, väikeaju ning piklikaju/ajusild)	Kõhunääre
Umbsool	Kõrvalkilpnäärmad
Käärsool	Perifeerne närv (istmiku- või sääreluu närv, eelistatavalt lihase lähedal)
Kaksteistsõrmiksool	Ajuripats
[Munandimanused]	Eesnääre
[Silmad (võrkkest, nägemisnärv) ja silmalaud]	Pärasool
Reieluu ja põlveliiges	Süljenäärmed
Sapipõis (kui see on olemas)	Seemnepõiekesed
[Harderi näärmed]	Nahk
Süda	Seljaaju (kaela-, rinna- ja nimmepiirkond)
Niudesool	Põrn
Tühisool	Rinnak
Neerud	Magu
[Pisaranäärmed (eksorbitaalsed)]	Hambad
Kõri (kolm taset, kaasa arvatud kõripealise põhi)	Munandid
Maks	Harknääre
Kopsud (kõik ühe tasandi sagarad, sh peamised bronhid)	Kilpnääre
Lümfisõlmed kopsu kopsuvarati piirkonnast, eelkõige vähe lahustuvatest osakestest koosneva uuritava kemikaali puhul. Põhjalikuma immunoloogilise suunitlusega vaatluse ja/või uuringu puhul võib kaaluda täiendavate lümfisõlmede säilitamist, näiteks keskseini, kaela/submandibulaarsest ja/või kõrva piirkonnast.	[Keel]
Lümfisõlmed (distaalsed sisenemisavast)	Hingetoru (vähemalt kaks tasandit, sh üks pikisuunaline lõige läbi hingetoruharja ja üks ristlõige)
Piimanääre (emasloomadel)	[Kusejuha]
Lihaskoed (reielihaskoed)	[Kusiti]
Nasofarüingealsed koed (vähemalt neljal tasandil; üks tasand peab hõlmama nasofarüingeaalset kanalit ja ninaga seotud lümfikude (NALT)).	Kusepõis
	Emakas
	Sihtorganid
	Kõik nähtavad kahjustused ja massid

▼ **M4**

43. Kopsud tuleks tervena eemaldada, kaaluda ja paigutada sobivasse fikseerivasse ainesse rõhul 20–30 cm veesammast, et tagada kopsude struktuuri säilimine (5). Tuleks koguda ühel tasandil tehtud lõiked kõikidest sagaratest, sh peamistest bronhidest, kuid kui tehakse kopsude lavaaž, tuleks sellest sagarast, millele lavaaži ei tehtud, teha lõiked kolmel tasandil (mitte seeria- viisilised lõiked).
44. Tuleks uurida vähemalt nelja nasofarüingeaalsete kudede tasandit, millest üks peaks hõlmama nasofarüingeaalset kanalit (5, 6, 7, 8, 9), et võimaldada asjakohaselt uurida skvamoosrakulist, ülemineku- (hingamisteede *clara*-rakud), hingamisteede (ripsepiteel) ja olfaktorset epiteeli ning neid dreenivat lümfikude (NALT) (10, 11). Tuleks uurida kõri kolme tasandit ja üks neist tasanditest peaks hõlmama kõripealise põhja (12). Tuleks uurida vähemalt kahte hingetoru tasandit, sh ühte pikisuunalist lõiget läbi peabronhide bifurkatsiooni harja ja ühte ristlõiget.

HISTOPATOLOOGIA

45. Kontrollrühma ja suure kontsentratsiooni rühma ning kõigi loomade puhul, kes uuringu jooksul surevad või surmataakse, tuleks teha kõigi tabelis 2 loetletud organite ja kudede histopatoloogiline hindamine. Eritähelepanu tuleks pöörata hingamisteedele, sihtorganitele ja nähtavatele kahjustustele. Organeid ja kudesid, milles suure kontsentratsiooni rühma isenditel leiti kahjustusi, tuleks uurida kõigi rühmade isenditel. Uuringu juht võib otsustada teha histopatoloogilised hindamised täiendavate rühmade puhul, et tõendada selget sõltuvust kontsentratsioonist. Kui kasutatakse satelliitrühma (pöörduvuse rühma), tuleks teha kõigi selliste kudede ja organite histopatoloogiline hindamine, milles katserühmade indiviididel leiti muutusi. Kui suure kokkupuute rühmas sureb liiga palju loomi varajases etapis või tekib muid probleeme, mis muudavad andmete tähenduse ähmaseks, tuleks histopatoloogiliselt uurida järgmise väiksema kontsentratsiooni rühma. Tuleks püüda omavahel seostada üldisi tähelepanekuid ja mikroskoopilisi leide.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmed**

46. Iga looma kohta tuleks esitada kehamassi, sööda tarbimise, kliinilise patoloogia, üldpatoloogia, organite massi ja histopatoloogia andmed. Kliiniliste vaatluste andmed tuleks esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates iga katserühma puhul ära osalenud loomade arvu, konkreetsete mürgistusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnuna leitud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöörduvuse ning lahanguleiud. Kõiki tulemusi, nii kvantitatiivseid andmeid kui ka üksiktähelepanekuid, tuleks sobiva statistilise meetodi abil hinnata. Võib kasutada kõiki üldtunnustatud statistilisi meetodeid; statistilised meetodid tuleks valida juba uuringu kavandamisel.

Katseprotokoll

47. Katseprotokoll peaks sisaldama võimaluse korral järgmist teavet.

Katseloomad ja pidamistingimused

- Puuritingimuste kirjeldus, sh: loomade arv (või arvu muutus) puuri kohta, allapanu, õhu temperatuur ja suhteline õhuniiskus, valgustuspeerood ja sööt.

▼ **M4**

— Kasutatud liik/liin ja muu liigi kui roti kasutamise põhjendus. Võib esitada lähteandmed ja varasemad andmed, kui need on saadud loomade kohta, kes viidi kemikaaliga kokkupuutesse samasugustes kokkupuute-, pidamis- ja nälgimistingimustes.

— Loomade arv, vanus ja sugu.

— Randomiseerimismeetod.

— Kõigi eelnenud ettevalmistamismeetmete kirjeldus, sh söötmine, karantiin ja haiguste ravi.

Uuritav kemikaal

— Füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikaliskemilised omadused (kaasa arvatud isomeerne koostis).

— Identifitseerimisandmed, Chemical Abstract Services Registry ehk CASi nr, kui see on teada.

Kandeaine

— Kandeaine kasutamise põhjendus ja kandeaine valiku põhjendus (kui kandeainena ei kasutata vett).

— Varasemad või rööpandmed, millega tõendatakse, et kandeaine ei mõjuta uuringu tulemusi.

Inhalatsioonikamber

— Inhalatsioonikambri üksikasjalik kirjeldus, sh selle mahu andmed ja joonis.

— Loomade kokkupuute jaoks kasutatavate seadmete päritolu ja kirjeldus ning samuti keskkonna tekitamise kirjeldus.

— Temperatuuri, niiskuse, osakeste suuruse ja tegeliku kontsentratsiooni mõõtmise seadmed.

— Õhuallikas ja õhu konditsioneerimiseks kasutatav süsteem.

— Homogeense katsekeskkonna tagamise seadmete kalibreerimisel kasutatud meetodid.

— Rõhuvahe (positiivne või negatiivne).

— Kokkupuuteportide arv kambri kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude); loomade paiknemine kambris (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).

— Katsekeskkonna (atmosfääri) stabiilsus.

— Temperatuuri- ja niiskusandurite paigutus ning katsekeskkonnast proovide võtmine kambris.

— Sissejuhitud ja väljatõmmatud õhu töötlemine.

— Õhuvoolu kiirused, õhuvoolu kiirus kokkupuutepordi kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude) või loomade hulk kambri kohta (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).

— Inhalatsioonikambri tasakaaluseisundini jõudmiseks vajalik aeg (t_{95}).

— Kogu kambris oleva õhu vahetuste arv tunnis.

— Mõõteseadmed (vajaduse korral).

Andmed kokkupuute kohta

— Põhiuuringu sihtkontsentratsiooni valimise põhjendus.

▼ M4

- Nimikontsentratsioonid (inhalatsioonikambrisse suunatud uuritava kemikaali kogumass, mis on jagatud läbi kambri juhitud õhu kogusega).
- Uuritava kemikaali tegelikud kontsentratsioonid loomade hingamistsoonist kogutud proovides; heterogeensel füüsilisel kujul esineva segu (gaas, aur, aerosool) puhul võidakse iga faasi eraldi analüüsida.
- Kõik õhukontsentratsioonid tuleks teatada massiühikuna (mg/l , mg/m^3 jne), mitte mahuühikuna (ppm, ppb jne).
- Osakeste suurusjaotus, massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) ja geomeetiline standardhälve (σ_g) ning nende arvutamise meetodid. Tuleks teatada üksikosakeste suuruse analüüsid.

Katsetingimused

- Üksikasjalikud andmed uuritava kemikaali ettevalmistamise kohta, sh andmed mis tahes meetmete kohta, mida kasutati tahke aine osakeste suuruse vähendamiseks või uuritava kemikaali lahuste valmistamiseks.
- Katsekeskkonna tekitamiseks ja loomade kokkupuuteks katsekeskkonnaga kasutatud seadmete kirjeldus (eelistatult koos joonisega).
- Kambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoo jälgimiseks kasutatud seadmete üksikasjad (st kalibreerimiskõvera koostamine).
- Kambrikontsentratsiooni ja osakeste suurusjaotuse määramise proovide kogumise seadmete andmed.
- Kasutatud keemilise analüüsi meetodi ja selle valideerimise üksikasjad (sh uuritava kemikaali analüütiline saagis proovivõtukeskkonna analüüsimisel).
- Loomade katse- ja kontrollrühma määramiseks kasutatud randomiseerimismeetod.
- Üksikandmed sööda ja vee kvaliteedi kohta (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas).
- Katsekontsentratsioonide valiku põhjendus.

Tulemused

- Tabelid katsekambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoolu kohta.
- Tabelid kambri nimi- ja tegeliku kontsentratsiooni andmete kohta.
- Tabelid osakeste suurusjaotuse andmete kohta, sh analüüsiproovide võtmise andmed, osakeste suurusjaotus ning MMAD ja σ_g arvutamine.
- Tabelid iga looma reageerimise ja kontsentratsioonide andmete kohta (st mürgistusnähtudega loomad, kaasa arvatud surnud loomad, mõjude laad, raskus, ilmumise aeg ja kestus).

▼ **M4**

- Tabel iga katselooma kehamassi kohta.
- Tabelid sööda tarbimise kohta.
- Tabelid kliinilise patoloogia andmete kohta.
- Iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.

Tulemuste arutelu ja tõlgendamine

- Eritähelepanu tuleks pöörata selliste meetodite kirjeldamisele, mida kasutati käesoleva katsemeetodi kriteeriumide täitmiseks, näiteks piirkontsentratsioon või osakeste suurus.
- Üldtulemuste alusel tuleks käsitleda küsimust, kas osakeste suurus oli sobiv sissehingamiseks, eelkõige siis, kui osakeste suuruse kriteeriume ei olnud võimalik täita.
- Uuringu üldhinnangus tuleks käsitleda nimi- ja tegelike kontsentratsioonide kindlaksmääramiseks kasutatud meetodite kooskõlalisust ning tegeliku ja nimikontsentratsiooni vahelist seost.
- Tuleks käsitleda tõenäolist surma põhjust ja uuritava kemikaali peamist toimeviisi (süsteemne või lokaalne).
- Kui OECD humaansete lõpetamiskriteeriumide juhenddokumendis (3) sätestatud kriteeriumide alusel tekkis vajadus humaansel viisil surmata valu kannatavaid või tõsiste ja püsivate kannatuste tunnustega loomi, siis tuleks esitada selgitus.
- Tuleks kindlaks teha sihtorgan(id).
- Tuleks määrata kindlaks täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) ja väikseim täheldatavat kahjulikku toimet avaldav kontsentratsioon (LOAEL).

KIRJANDUS

- 1) OECD (1981). *Subchronic Inhalation Toxicity Testing*, Original Test Guideline No 413, Environment Directorate, OECD, Paris.
- 2) OECD (2009). *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- 3) OECD (2000). *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- 4) Whalan E and Redden JC (1994). *Interim Policy for Particle Size and Limit Concentration Issues in Inhalation Toxicity Studies*. Office of Pesticide Programs, United States Environmental Protection Agency.
- 5) Dungworth DL, Tyler WS, Plopper CE (1985). *Morphological Methods for Gross and Microscopic Pathology* (Chapter 9) in *Toxicology of Inhaled Material*, Witschi, H.P. and Brain, J.D. (eds), Springer Verlag Heidelberg, pp. 229–258.
- 6) Young JT (1981). *Histopathological examination of the rat nasal cavity*. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1: 309–312.
- 7) Harkema JR (1990). *Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants*. *Environ. Health Perspect.* 85: 231–238.

▼M4

- 8) Woutersen RA, Garderen-Hoetmer A, van Slootweg PJ, Feron VJ (1994). Upper respiratory tract carcinogenesis in experimental animals and in humans. In: Waalkes MP and Ward JM (eds) Carcinogenesis. Target Organ Toxicology Series, Raven Press, New York, 215–263.
- 9) Mery S, Gross EA, Joyner DR, Godo M, Morgan KT (1994). Nasal diagrams: A tool for recording the distribution of nasal lesions in rats and mice. *Toxicol. Pathol.* 22: 353–372.
- 10) Kuper CF, Koornstra PJ, Hamelers DMH, Biewenga J, Spit BJ, Duijvestijn AM, Breda Vriesman van PJC, Sminia T (1992). The role of nasopharyngeal lymphoid tissue. *Immunol. Today* 13: 219–224.
- 11) Kuper CF, Arts JHE, Feron VJ (2003). Toxicity to nasal-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Lett.* 140–141: 281–285.
- 12) Lewis DJ (1981). Mitotic Indices of Rat Laryngeal Epithelia. *Journal of Anatomy* 132(3): 419–428.
- 13) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼ M4

1. liide

MÕISTE

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M4

B.30. KROONILISE MÜRGISUSE UURINGUD

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 452 (2009). Esialgne katsejuhend TG 452 võeti vastu 1981. aastal. Käesoleva läbiivaadatud katsemeetodi B.30 koostamist peeti vajalikuks, et võtta arvesse hiljutist arengut loomade heaolu ja regulatiivsete nõuete valdkonnas (1, 2, 3, 4). Katsemeetodit B.30 on ajakohastatud paralleelselt käesoleva lisa peatüki B.32 („Kantserogeensuse uuringud”) ja peatüki B.33 („Kombineeritud kroonilise mürgisuse/kantserogeensuse uuringud”) läbivaatamisega selleks, et saada uuringus kasutatavate loomade abil lisateavet ning esitada täpsemaid andmeid dooside valiku kohta. Käesolev katsemeetod on koostatud selleks, et kasutada seda mitmesuguste kemikaalide, sh pestitsiidide ja tööstuslike kemikaalide katsetamiseks.
2. Enamik kroonilise mürgisuse uuringuid tehakse närliselikeidega ja käesolev katsemeetod on seega kavandatud peamiselt kasutamiseks nende liikidega tehtavate uuringute puhul. Kui selliseid uuringuid on vaja teha mittenärlilistega, võib samuti rakendada käesolevas katsemeetodis kirjeldatud põhimõtteid ja menetlusi koos põhimõtete ja menetlustega, mida on kirjeldatud käesoleva lisa peatükis B.27 („Korduvdoosi suukaudse mürgisuse 90-päevane uuring mittenärliliste puhul”) (5) koos asjakohaste muudatustega, nagu on sätestatud OECD juhenddokumendis nr 116, mis käsitleb kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute kavandamist ja teostamist (6).
3. Kroonilise mürgisuse uuringutes kasutatavad kolm peamist manustamisteed on suukaudne, nahakaudne ja sissehingamise teel manustamine. Manustamisviisi valik sõltub uuritava kemikaali füüsikalistest ja keemilistest omadustest ning inimeste peamisest võimalikust ainega kokkupuutumise viisist. Lisateave kokkupuutete valimise kohta on esitatud OECD juhenddokumendis nr 116 (6).
4. Käesolevas katsemeetodis on keskendutud suukaudsele manustamisele, mis on kroonilise mürgisuse uuringutes enim kasutatav manustamistee. Kuigi inimeste tervist ohustavate riskide hindamiseks võivad vajalikud olla ka pikaajalised kroonilise mürgisuse uuringud, mis hõlmavad nahakaudset või sissehingamise teel toimuvat kokkupuudet, ja/või neid võidakse nõuda teatavate eeskirjadega, on mõlema nimetatud kokkupuutete puhul katsete korraldamine tehniliselt keeruline. Kõnealused uuringud tuleb kavandada juhtumipõhiselt, kuigi siin suukaudse manustamise kroonilise mürgisuse hindamiseks kirjeldatud katsemeetodi võib võtta aluseks sissehingamise teel ja/või nahakaudse manustamise uuringu katse-eeskirja koostamisel ja arvestades manustamise ajavahemikke, kliinilisi ja patoloogilisi parameetreid jne käsitlevaid soovitusi. On olemas OECD juhenddokumendid uuritava kemikaali sissehingamise teel (6, 7) ja nahakaudselt (6) manustamise kohta. Kui kavandatakse sissehingamise teel toimuvat kokkupuudet hõlmavaid pikaajalisi uuringuid, tuleks eelkõige vaadata käesoleva lisa peatükke B.8 (8) ja B.29 (9) koos sissehingamise avalduva ägeda mürgisuse uurimist käsitleva OECD juhenddokumendiga (7). Nahakaudse manustamise katsete tegemisel tuleks vaadata käesoleva lisa peatükki B.9 (10).

▼ **M4**

5. Kroonilise mürgisuse uuring annab teavet võimalike terviseriskide kohta, mis võivad tõenäoliselt tekkida korduva kokkupuute korral kasutatava liigi eluea märkimisväärse osa jooksul. Uuringuga saadakse teavet uuritava kemikaali mürgiste mõjude kohta, tehakse kindlaks sihtorganid ja kemikaali akumulatsiooni võimalikkus. Uuringuga võib ka hinnata täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsiooni, mida võib kasutada inimeste kokkupuute jaoks ohutuskriteeriumide kehtestamiseks. Samuti rõhutatakse vajadust teha loomade hoolikas kliiniline läbivaatus, et hankida võimalikult palju teavet.

6. Käesoleva katsemeetodi kohaste uuringute eesmärgid on järgmised:
 - uuritava kemikaali kroonilise mürgisuse kindlaksmääramine;

 - sihtorganite tuvastamine;

 - mõju doosist sõltuvuse kirjeldamine;

 - täheldatava kahjuliku toimeta doositaseme (*no-observed-adverse-effect level*, NOAEL) või võrdlusdoosi (*Benchmark Dose*, BMD) kindlakstegemiseks lähtepunkti määramine;

 - kroonilise mürgise mõju prognoosimine inimeste kokkupuutetasemetel;

 - andmete saamine toimeviisi käsitlevate hüpoteeside kontrollimiseks (6).

LÄHTEKAALUTLUSED

7. Uuritava kemikaali toksikoloogiliste omaduste hindamisel peaks uurimislabor enne uuringu tegemist võtma arvesse kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, et uuringu kavandamisel keskenduda kroonilise toksilisuse võimaluse kõige tõhusamale katsetamisele ja minimeerida loomade kasutamine. Uuringu kavandamist hõlbustav teave hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalised-keemilised omadused; mis tahes teave toimeviisi kohta; *in vitro* või *in vivo* mürgisuse katsete tulemused; eeldatav/eeldatavad kasutusvaldkond/-valdkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; samalaadse struktuuriga ainete kohta olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed ja toksikoloogilised andmed; olemasolevad toksiko-kineetilised andmed (võimaluse korral ühekordse doosi ja korduvdoosi kineetika) ning muude korduva kokkupuute uuringute käigus saadud andmed. Kroonilist mürgisust tuleks uurida alles pärast esialgse mürgisust käsitleva teabe saamist korduvdoosi 28-päevasest ja/või 90-päevasest mürgisuse katsest. Konkreetse uuritava kemikaali võimalike kahjulike tervisemõjude üldhindamisel tuleks kaaluda kroonilise mürgisuse järkjärgulise uurimise lähenemisviisi (11, 12, 13, 14).

8. Enne uuringu alustamist tuleks uuringu kava ja eesmärkide alusel kindlaks määrata kõige sobivamad tulemuste analüüsi statistilised meetodid. Tuleb kaaluda ka seda, kas statistikas tuleks arvestada ellujäämise parandust ja analüüsi tegemist sel juhul, kui üks või mitu rühma tuleb enneaeagselt surmata. Suunised asjakohaste statistiliste analüüside tegemiseks ja peamised viited rahvusvaheliselt tunnustatud statistilistele meetoditele on esitatud juhenddokumentides nr 116 (6) ning nr 35, milles käsitletakse kroonilise mürgisuse ja kantseroogeensuse uuringute analüüsi ja hindamist (15).

▼ **M4**

9. Kroonilise mürgisuse uuringu tegemisel tuleks alati järgida suunispõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on sätestatud OECD juhenddokumendis nr 19 kliiniliste nähtude tuvastamise, hindamise ja kasutamise kohta ohutuse hindamisel kasutatavate katseloomade humaansete lõpetamiskriteeriumidena (16) ja eelkõige selle punktis 62. Kõnealusel punktis on sätestatud, et „[k]ui uuringutes, milles kasutatakse korduvat annustamist, tekivad loomal kliinilised progresseeruvad nähud, mis põhjustavad tema seisundi halvenemise, tuleb teha andmetel põhinev otsus, kas loom tuleks humaansel viisil surmata. Otsuse tegemisel tuleks kaaluda kõnealuse uuringus osaleva looma jätkuvast elushoidmisest saadava teabe väärtust võrreldes looma üldise seisundiga. Kui tehakse otsus kõnealune loom katsesse jätta, siis tuleks vajaduse korral suurendada vaatluste sagedust. Ilma katse eesmärki kahjulikult mõjutamata võib samuti olla võimalik annustamise ajutine peatamine, kui see vähendab looma valu või kannatust, või katsedoozi vähendamine.”
10. Üksikasjalikke suuniseid ja arutelu kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute doosi valimise põhimõtete kohta on võimalik leida juhenddokumendist nr 116 (6) ning samuti kahest rahvusvahelise bioteaduste instituudi väljaandest (17, 18). Doosi valimise strateegia sõltub põhiliselt uuringu peamisest eesmärgist või peamistest eesmärkidest (punkt 6). Sobivate doositasemete valimisel tuleks saavutada tasakaal ühelt poolt ohu sõeluuringute ja teiselt poolt väikese doosi mõju iseloomustamise ning doosi ja mõju vahelise seose kindlakstegemise vahel. See on eriti oluline juhul, kui tehakse kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuring (käesoleva lisa peatükk B.33; punkt 11).
11. Tuleks kaaluda eraldi kroonilise mürgisuse uuringu (käesolev katsemeetod B.30) ja kantserogeensuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.32) tegemise asemel kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.33) tegemist. Kombineeritud katse võimaldab kokku hoida aega ja kulusid, võrreldes kahe eraldi uuringu tegemisega, kuid annab samasuguse kvaliteediga andmed nii kroonilise mürgisuse kui ka kantserogeensuse kohta. Kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.33) tegemisel tuleks siiski hoolikalt kaaluda doosi valimise põhimõtteid (punktid 9 ja 20–25) ning tuleb ka arvestada, et mõnikord nõutakse eraldi uuringute tegemist eeskirjadega.
12. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud selle peatüki lõpus ja juhenddokumendis nr 116 (6).

KATSE PÕHIMÕTE

13. Uuritavat kemikaali manustatakse iga päev astmeliselt suurenevate doosidena mitmele katseloomade rühmale üldjuhul 12 kuu vältel, kuigi regulaarsetest nõuetest olenevalt võib katse kestus olla ka pikem või lühem (vt punkt 33). Katse selline kestus tagab, et see on piisavalt pikk kumulatiivse mürgisuse mõjude avaldamiseks, kuid tulemusi ei hakka veel segama geriaatrilised muutused. Kõrvalekaldeid 12-kuulisest kokkupuute kestusest tuleks põhjendada, eelkõige lühema kestuse puhul. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt suu kaudu, kuigi ka sissehingamise või nahakaudse kokkupuute uurimine võib olla sobiv. Uuringu kavaga võib ette näha ühe või mitu vahepealset surmamist, näiteks kolme ja kuue kuu möödudes, ja selle võimaldamiseks võib kasutada täiendavaid loomarühmi (vt punkt 19). Manustamisperioodi jooksul vaadeldakse loomi põhjalikult toksilisuse märkide tuvastamiseks. Katse ajal surnud või tapetud loomad lahatakse ning katse lõppemisel tapetakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

▼ **M4****MEETODI KIRJELDUS****Loomaliigi valimine**

14. See katsemeetod hõlmab kroonilise mürgisuse hindamist peamiselt näriliste puhul (vt punkt 2), kuigi tuleb arvestada, et mõnikord võidakse eeskirjadega nõuda samalaadsete katsete tegemist muude loomadega kui närilised. Liigi valikut tuleks põhjendada. Kui nõutakse kroonilise mürgisuse uuringut muu liigiga kui närilised, peaks selle kavandamine ja tegemine toetuma põhimõtetele, mis on esitatud käesolevas katsemeetodis ja käesoleva lisa peatükis B.27 („Korduvdoosi suukaudse mürgisuse 90-päevane uuring mittenäriliste puhul”) (5). Lisateave liigi ja aretusliini valimise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (6).
15. Käesoleva katsemeetodi puhul on eelistatud näriliselik rott, kuigi kasutada võib ka muid närilisi, nt hiiri. Rotid ja hiired on olnud eelistatud katsemudelid tänu nende suhteliselt lühikesele elueale, laialdasele kasutamisele farmakoloogia- ja toksikoloogiauringutes, võimalusele kutsuda neil kergesti esile kasvajaid ja tänu piisavalt iseloomustatud liinide kättesaadavusele. Nende omaduste tulemusena on olemas palju teavet nende füsioloogia ja patoloogia kohta. Kasutatakse enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi. Kroonilise mürgisuse uuring tuleks teha loomadega, kes on samast liinist ja sama päritoluga kui loomad, keda kasutati lühema kestusega esialgses mürgisuse kindlakstegemise uuringus. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined.

Pidamis- ja söötmingimused

16. Loomi võib hoida eraldi või väikestes samast soost loomade rühmades; eraldi pidamist tuleks kaaluda ainult juhul, kui see on teaduslikult põhjendatud (19, 20, 21). Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (±3 °C). Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärasest labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata. Sööt peaks vastama kõigile uuritava liigi toitumisvajadustele ja sööda saasteainesisaldus, sh pestitsiidijäägid, püsivad orgaanilised saasteained, fütoöstrogeenid, raskmetallid ja mükotoksiinid, mis võivad mõjutada katse tulemusi, peaks olema võimalikult väike. Regulaarselt tuleks analüüsida sööda toitaineid ja saasteainete sisaldust; vähemalt tuleks seda teha uuringu alguses ja siis, kui hakatakse kasutama uut söödapartiid, ning analüüsida tulemused tuleks esitada lõpparuandes. Samuti tuleks esitada uuringus kasutatud joogivee analüüsi andmed. Sööda valikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali jaoks sobiv segu ja rahuldada loomade toitumisvajadused, kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga.

Loomade ettevalmistamine

17. Kasutada tuleks terveid loomi, kes on laboritingimustega vähemalt seitsme päeva jooksul kohanenud ning keda ei ole varem uuringutes kasutatud. Näriliste korral tuleks loomadele uuritava kemikaali annustamist alustada võimalikult varakult pärast võõrutamist ja kohanemist ning eelistatavalt enne, kui loomad on kaheksa nädala vanused. Katseloomi tuleks kirjeldada ja teatada liik, liin, päritolu, sugu, kehamass ja vanus. Uuringu alguses peaks kummagi soo loomade kehamassi erinevus olema minimaalne ja kõrvalekalle ei tohiks ületada 20 % uuringus kasutatavate loomade keskmisest kehamassist, mis leitakse eraldi kummagi soo loomade jaoks. Loomad tuleks

▼M4

kontroll- ja katserühmadesse jaotada juhuslikkuse alusel. Pärast juhuslikkuse alusel jaotamist ei tohiks rühmades kummagi soo keskmised kehamassid oluliselt erineda. Kui erinevused on statistiliselt olulised, tuleks juhuslikkuse alusel jaotamise etappi võimaluse korral korrata. Iga loomale tuleks määrata ainuline tunnusnumber ja loom tuleks kõnealuse numbriga püsivalt märgistada tätoveerimise, mikrokiibi paigaldamise või muu sobiva meetodi abil.

KATSE KÄIK**Loomade arv ja sugu**

18. Tuleks kasutada mõlemat sugu. Tuleks kasutada piisavalt palju loomi, et uuringu lõpus oleks igas rühmas küllalt loomi põhjalikuks bioloogiliseks ja statistiliseks hindamiseks. Näriliste puhul tuleks tavaliselt igas doositaseme rühmas kasutada vähemalt 20 looma kummastki soost ning mittenäriliste puhul on rühmas soovitatav kasutada vähemalt nelja looma kummastki soost. Hiirtega tehtavates uuringutes võib olla vajalik kasutada igas doositaseme rühmas rohkem loomi, et teha kõik nõutavad hematoloogilised analüüsid.

Loomade vahepealne surmamine, satelliitrühmad ja kontrollloomad

19. Kui see on teaduslikult põhjendatud, võib uuringus ette näha vahepealsed surmamised (vähemalt kümme looma kummagi soo ja iga doosirühma kohta), näiteks kuue kuu möödumisel, et saada teavet toksikoloogiliste muutuste arengu kohta ja toimemehhanismi kohta. Kui selline teave on uuritava kemikaaliga tehtud varasematest korduvdoosi mürgisuse uuringutest juba olemas, ei pruugi vahepealsed surmamised olla teaduslikult põhjendatud. Samuti võib kaasata satelliitrühmi, et jälgida uuritava kemikaali põhjustatud toksikoloogiliste muutuste pöördumist; nende puhul kasutatakse üldjuhul uuringu kõrgeimat doseerimistaset ja kontrollrühma. Vajaduse korral võib uuringu vältel lisada haigusseisundi seireks ka täiendava kontrollloomade rühma (üldjuhul viis looma kummastki soost) (22). Kui kavandatakse vahepealseid surmamisi või satelliit- või kontrollloomade rühmade kasutamist, tuleks uuringuprojekti kaasatud loomade arvu suurendada nende loomade arvu võrra, kes kavatsetakse enne uuringu lõppu surmata. Selliste loomade puhul tuleks üldjuhul teha samad vaatlused, sh kehamassi ja sööda/vee tarbimise mõõtmised, hematoloogilised ja kliinilise biokeemia mõõtmised ning patoloogiuuringud, kui põhiuuringu kroonilise mürgisuse etapi loomade puhul, kuigi võib ka otsustada, et vahepealse surmamise rühmade puhul piirdatakse konkreetsete peamiste näitajate, näiteks neurotoksilisuse või immunotoksilisuse mõõtmisega.

Doosirühmad ja doseerimine

20. Juhendid kõigi doosi valiku ja doositaseme intervallidega seotud asjaolude kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (6). Uuringus tuleb kasutada vähemalt kolme doositaset ja uuringuga samal ajal peab tegema ka kontrolli, välja arvatud siis, kui tehakse piirsalduskatse (vt punkt 27). Doositasemed põhinevad üldjuhul lühema ajavahemiku korduvdoosi või doosipiirkonna määramise katse tulemustel ja nende puhul tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali või samalaadsete kemikaalide kohta olemasolevat toksikoloogia- ja toksikokineetikaalast teavet.

▼ **M4**

21. Kui uuritava kemikaali füüsikalised-keemilised omadused või bioloogiline mõju seda ei piira, peaks kõrgeim doositase olema üldiselt valitud nii, et saaks määrata kindlaks peamised sihtorganid ja toksilise toime, põhjustamata siiski kannatusi, ägedat mürgisust, haigestumist või surma. Punktis 22 allpool loetletud asjaolusid arvesse võttes tuleks valida kõrgeim doositase, et saada tõendusmaterjali mürgisuse kohta, näiteks kehamassi tõusu vähenemise kaudu (ligikaudu 10 %).
22. Sellest hoolimata võidakse uuringu eesmärkidest olenevalt (vt punkt 6) valida suurim doos, mis jääb allapoole mürgisust tõendavat doosi, näiteks kui doos avaldab teatavat kahjulikku mõju, kuid siiski ei mõjuta eluiga ega kehamassi. Suurim doos ei tohiks ületada 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas (piirdoos, vt punkt 27).
23. Doositaseme ja doositasemete intervalli võib valida nii, et määrata kindlaks mõju sõltuvus doosist, täheldatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) või muu soovitud uuringutulemus, näiteks võrdlusdoos (BMD) (vt punkt 25) madalaimal doositasemel. Asjaolud, mida tuleks väiksemate dooside valimisel arvesse võtta, on toime doosist sõltuvuse eeldatav suurenemine, doosid, mis võivad põhjustada olulisi metaboliseerimise muutusi või toksilisuse toimemehhanismi muutumist, kui eeldatakse läviväärtuse olemasolu, või mille puhul eeldatakse väikeste dooside ekstrapoleerimise lähtepunkti olemasolu.
24. Doositasemete vahemik sõltub uuritava kemikaali omadustest ja seda ei saa käesoleva katsemeetodiga ette kirjutada, aga kahe- kuni neljakordne vahemik annab sageli häid katsetulemusi, kui seda kasutatakse alanevate doositasemete määramiseks, ning dooside vahel väga suure (näiteks rohkem kui kuue- kuni kümnekordse) vahemiku kasutamise asemel on sageli parem lisada neljas katserühm. Üldiselt tuleks vältida kümnest suurema kordaja kasutamist ja kui seda tehakse, tuleks seda põhjendada.
25. Nagu juhenddokumendis nr 116 (6) on täpsemalt kirjeldatud, tuleb doosi valimisel arvesse võtta järgmist:
- doosi-toime sõltuvuse teadaolev või oletatav mittelineaarsus või murdepunkt;
 - toksikokineetika ja doosipiirkonnad, mille puhul esineb metaboolne induktioon, küllastumine või välise ja sisemiste dooside vaheline mittelineaarsus või neid ei esine;
 - esmaskahjustused, toimemarkerid või märgid sellest, et tuleb arvesse võtta peamiste bioloogiliste alusprotsesside toimumist;
 - peamised (või oletatavad) toimeviisi asjaolud, näiteks annused, mille juures hakkab suurenema tsütotoksilisus, mõjutatakse hormoonitasemeid, homeostaasi säilitamise mehhanismid saavad üle koormatud jne;
 - mõju doosist sõltuvuse kõvera piirkonnad, kus on vaja eriti usaldusväärset hinnangut, näiteks eeldatava võrdlusdoosi (BMD) vahemikus või oletatava läviväärtuse juures;
 - inimeste kokkupuute eeldatava tasemega seotud kaalutlused.

▼ **M4**

26. Kontrollrühm on rühm, kellega katseid ei tehta, või kandeaine kontrollrühm, kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui katserühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui kasutatakse kandeainet, saab kontrollrühm kandeainet kõige suuremas koguses, mida kasutatakse doosirühmades. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga ja katseloomad söövad seda sööda halvema maitse tõttu oluliselt vähem, võib asjakohasema kontrollrühma tagamiseks olla sobiv täiendav kontrollrühm, kes saab samapalju sööta, kui doosirühmas ära süüakse.
27. Kui eeluuringust saadud teabe alusel võib oletada, et katse ühel doositasemel, mis on võrdväärne päevas vähemalt 1 000 mg-ga kehamassi kg kohta ja mille puhul kasutatakse käesoleva uuringu jaoks kirjeldatud meetodeid, ei põhjusta tõenäoliselt kahjulikku mõju ja kui samalaadse struktuuriga ainete andmete alusel mürgisust ei eeldata, siis ei tarvitse kolme doositaseme kasutamisega täismahus uuring olla vajalik. Võib kasutada piirdoosi 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas, välja arvatud juhul, kui inimese võimalikku kokkupuudet arvestades on vaja kasutada suuremat doositaset.

Dooside ettevalmistamine ja uuritava kemikaali manustamine

28. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt suu kaudu koos sööda või joogiveega või sundsöötmisega. Lisateave manustamisteede ja -meetodite kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (6). Manustamistee ja -meetod sõltub uuringu eesmärgist, uuritava kemikaali füüsikalistest/keemilistest omadustest, biosaadavusest ja inimese uuritava kemikaaliga kokkupuutumise peamisest teest ja viisist. Manustamistee ja -meetodi valikut tuleks põhjendada. Loomade heaolu huvides tuleks suukaudne manustamine sundsöötmisega üldiselt valida ainult selliste ainete jaoks, mille puhul see manustamistee ja -meetod on põhjendatult sarnane inimese võimaliku kokkupuutega kemikaaliga (näiteks ravimid). Toidu- või keskkonnakemikaalide puhul, sh pestitsiidide puhul toimub manustamine tavaliselt sööda või joogivee kaudu. Mõne stsenaariumi puhul, näiteks kokkupuude töökohal, võib olla asjakohasem manustada kemikaali muul viisil.
29. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Vastavalt vajadusele tuleks arvesse võtta järgmisi kandeaine ja muude lisandite omadusi: mõju uuritava aine imendumisele, jaotumisele, metaboliseerimisele või retentsioonile; mõju uuritava kemikaali keemilistele omadustele, mis võivad muuta selle toksilisi omadusi, ning mõjud sööda või vee tarbimisele või loomade toitumisele. On soovitatav, et võimaluse korral kaalutakse esmalt vesilahuse/-suspensiooni kasutamist, seejärel õlilahuse/-emulsiooni (nt maisiõli) kasutamist ja siis võimalikku lahust muus kandeaines. Muu kandeaine kui vee puhul tuleks teada kandeaine mürgiseid omadusi. Tuleks teada uuritava kemikaali stabiilsust ning doseerimislahuste või sööda (nagu on asjakohane) homogeensust manustamise tingimustes (näiteks söödaga).
30. Nende kemikaalide puhul, mida manustatakse sööda või joogiveega, on oluline tagada, et sisseantavad uuritava kemikaali kogused ei muudaks tavalist toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Pikas mürgisuse uuringus, kus kemikaali manustatakse sööda kaudu, ei tohiks uuritava kemikaali kontsentratsioon söödas üldiselt olla suurem kui 5 % sööda üldkogusest, et vältida tasakaalustamata toitumist. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni söödas (mg sööda kg kohta või ppm) või püsivat doositaset looma kehamassi alusel (mg kehamassi kg kohta), mis arvutatakse iga nädal. Tuleks täpsustada, millist võimalust kasutatakse.

▼ **M4**

31. Suukaudse manustamise korral saavad loomad uuritavat kemikaali iga päev (seitse päeva nädalas) üldjuhul 12 kuu vältel (vt ka punkt 33), kuigi regulatiivsetest nõuetest olenevalt võib vaja minna ka pikemat katset. Iga muud doseerimiskava, nt viis päeva nädalas, tuleb põhjendada. Nahakaudse manustamise puhul töödeldakse loomi üldjuhul uuritava kemikaaliga 12 kuu vältel vähemalt kuus tundi päevas seitse päeva nädalas, nagu on sätestatud käesoleva lisa peatükis B.9 (10). Sissehingamise teel toimuv kokkupuude toimub kuus tundi päevas ja seitse päeva nädalas; võib kasutada ka kokkupuudet viiel päeval nädalas, kui see on põhjendatud. Kokkupuuteperiood on üldjuhul 12 kuud. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu näriliseliigi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Kui päevas kasutatakse alla kuuetunnist kokkupuute kestust, tuleks seda põhjendada. Vt ka käesoleva lisa peatükk B.8 (8).
32. Kui loomadele manustatakse uuritavat kemikaali sundsöötmisega, tuleks seda teha iga päev umbes samal kellaajal maosondi või sobiva intubatsioonianüüli abil. Üldiselt manustatakse üks annus üks kord päevas; kui aga kemikaal on näiteks lokaalne ärritaja, võib igapäevase doosimäära säilitada, manustades jaotatud annust (kaks korda päevas). Suurim vedelikukogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus peaks olema nii väike kui praktiliselt võimalik ega tohiks üldjuhul näriliste puhul ületada 1 ml kehamassi 100 g kohta (22). Katses kasutatava mahu erinevusi tuleks vähendada miinimumini; püsiva mahu tagamiseks tuleks kõikidel doositasemetel kasutada erinevaid kontsentratsioone. Erandiks on võimaliku söövitava või ärritava mõjuga kemikaalid, mida tuleb tugeva paikse mõju vältimiseks lahjendada. Tuleks vältida katseid kontsentratsioonidel, mis tõenäoliselt võivad seedetrakti söövitada või ärritada.

Uuringu kestus

33. Kuigi käesolev katsemeetod on peamiselt kavandatud kroonilise mürgisuse 12-kuulise uuringuna, võimaldab uuringu kava ka lühema (näiteks kuus või üheksa kuud) või pikema (näiteks 18 või 24 kuud) kestusega uuringuid, olenevalt konkreetsetest eeskirjadest või teatavatest toimemehhanismiga seotud eesmärkidest. Kõrvalekaldeid 12-kuulisest kokkupuute kestusest tuleks põhjendada, eelkõige lühema kestuse puhul. Uuritava kemikaali põhjustatud toksikoloogiliste muutuste pöördumise jälgimiseks kasutatavaid satelliitühmi tuleks pärast kokkupuute lõpetamist hoida ilma annustamiseta vähemalt neli nädalat ja mitte rohkem kui kolmandiku uuringu kogukestusest. Täpsemad juhendid, sh uuringus ellujäämise arvestamise kohta, on esitatud juhenddokumendis nr 116 (6).

VAATLUSED

34. Kõiki loomi tuleks haigestumise või suremise suhtes kontrollida, tavaliselt iga päeva alguses ja lõpus, sh nädalavahetustel ja pühadel. Vähemalt üks kord päevas tuleks teha üldine kliiniline läbivaatus, eelistatavalt igal päeval samal ajal / samadel aegadel, arvestades sundsöötmisega manustamise puhul eeldatava mõju kõrgperioodi pärast doseerimist.

▼ **M4**

35. Kõik loomad tuleks üksikasjalikult kliiniliselt läbi vaadata vähemalt kord enne esimest kokkupuudet (et võimaldada iga katselooma seisundi muutumise võrdlusi), uuringu esimese nädala lõpus ja seejärel iga kuu. Vaatlused tuleks korraldada nii, et üksikute vaatlejate vahelised erinevused oleksid minimeeritud ega sõltuks katserühmast. Need vaatlused tuleks teha väljaspool puuri, eelistatavalt selleks ette nähtud kohas ja iga kord samal ajal. Tulemused tuleks hoolikalt üles märkida, kasutades selleks võimaluse korral katselabori selgelt kindlaks määratud hindamissüsteeme. Tuleks püüda tagada, et vaatlustingimuste varieeruvus oleks minimaalne. Üles tuleks märkida vähemalt järgmised tunnused: muutused nahal, karvastikus, silmades, limaskestal, eritiste esinemine ning autonoomsed muutused (nt pisaravool, turris karv, pupillide suurus ja muutunud hingamine). Samuti tuleks üles märkida muutused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad endaga ümberkäimisele reageerivad, kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid (nt ülemäärane karvastiku hooldamine, ringiratast keerlemine) või kummaline käitumine (nt enese vigastamine, tagurpidi liikumine) (24).
36. Enne uuritava kemikaali esmakordset manustamist tuleks oftalmoskoobi või muu sobiva seadme abil teha kõikide loomade oftalmoloogiline kontroll. Pärast uuringu lõppu tuleks kõnealune kontroll teha eelistatavalt kõikidele loomadele, kuid vähemalt suure doosi rühma ja kontrollrühma loomadele. Kui silmades avastatakse muutusi, tuleb läbi vaadata kõik loomad. Kui struktuurianalüüs või muu teave viitab mürgisusele silmade suhtes, tuleks silmi kontrollida sagedamini.
37. Kui kemikaali varasem korduvannuse 28-päevane ja/või 90-päevane mürgisuse uuring näitas võimalikku neurotoksilist mõju, võib soovi korral enne uuringu algust ja kolmekuuliste ajavahemike järel pärast uuringu algust kuni 12 kuuni (kaasa arvatud) ning samuti uuringu lõpus (kui uuring kestab kauem kui 12 kuud) uurida erinevat tüüpi stiimulitele (24) (näiteks helilised, visuaalsed ja propriotseptiivsed stiimulid) sensoorset reageerimist (25, 26, 27), hinnata haardetugevust (28) ja motoorset tegevust (29). Võimalike meetodite täpsemad üksikasjad on esitatud vastavates viidetes. Siiski võib kasutada ka muid meetodeid kui need, millele viidatakse.
38. Sellise kemikaali puhul, mille varasem korduvannuse 28-päevane ja/või 90-päevane mürgisuse uuring näitas immunotoksilise mõju võimalikkust, võib soovi korral teha uuringu lõpul kõnealuse näitaja täiendavaid uuringuid.

Kehamass, sööda ja vee tarbimine ning söödakasutuse tõhusus

39. Kõik loomad tuleks kaaluda kemikaali manustamise alguses, vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Sööda tarbimist ja söödakasutuse tõhusust tuleks mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ning seejärel vähemalt kord kuus. Kui kemikaali manustatakse joogiveega, siis tuleks vee tarbimist mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Joogivee tarbimise mõõtmisi tuleks kaaluda ka uuringute puhul, milles muutub loomade joomiskäitumine.

▼ **M4****Hematoloogia ja kliiniline biokeemia**

40. Näriliste uuringutes tuleks hematoloogilised uuringud teha vähemalt kümne isas- ja kümne emasloomaga rühma kohta kolme, kuue ja 12 kuu möödumisel ning samuti uuringu lõpus (kui uuring kestab kauem kui 12 kuud); kõik uuringud tehakse alati samadel loomadel. Hiirte puhul võib kõikide nõutavate hematoloogiliste näitajate määramiseks minna vaja satelliitloomi (vt punkt 18). Muude loomade kui näriliste uurimisel võetakse proovid väiksemalt arvult loomadelt (koerte uurimisel näiteks neljalt loomalt kummagi soo ja iga rühma kohta) vahepealsetel proovivõtu aegadel ja uuringu lõpus, nagu on kirjeldatud näriliste puhul. Kui võrreldavate doositasemetega tehtud varasema 90-päevase uuringu vältel ei tuvastatud mõju hematoloogilistele parameetritele, ei ole kolme kuu möödumisel vaja mõt-misi teha ei näriliste ega muude loomade puhul. Vereproovid tuleks võtta määratud kohast, näiteks otse südamest või retroorbitaalsest siinusest, kasutades tuimestust.
41. Tuleks uurida järgmisi parameetreid (30): leukotsüütide üldarv ja diferentseeritud leukotsüüdiarvud, erütrotsüütide arv, vereliistakute arv, hemoglobiini kontsentratsioon, hematokrit (rakkude protsent vere üldmahus), erütrotsüütide keskmine maht (MCV), hemoglobiini keskmine kogus erütrotsüüdis (MCH), hemoglobiini keskmine kontsentratsioon erütrotsüüdis (MCHC), protrombiini aeg ja aktiveeritud osalise tromboplastiini aeg. Vajaduse korral võib mõõta muid hematoloogiaparameetreid, näiteks Heinzi kehakesi või muid atüüpilisi erütrotsüüdivorme või methemoglobiini, olenevalt uuritava kemikaali mürgisusest. Üldiselt tuleks kasutada paindlikku lähenemisviisi sõltuvalt konkreetse uuritava kemikaali puhul täheldatud ja/või eeldatavast mõjust. Kui uuritav kemikaal mõjutab vere-loomesüsteemi, võib olla vajalik uurida samuti retikulotsüütide arvu ja luuüdi tsütoloogiat, kuigi need uuringud ei ole alati vajalikud.
42. Olulise kudesid kahjustava toksilise mõju ning eelkõige neerusid ja maksa kahjustava mõju uurimiseks tehakse kliinilise biokeemia analüüsid vereproovidega, mis on võetud vähemalt kümnelt isas- ja kümnelt emasloomalt rühma kohta samade ajavahemike järel, mis on ette nähtud hematoloogiliste uuringute puhul; proovid võetakse alati samadel loomadelt. Hiirte puhul võib kõikide nõutavate kliinilise biokeemia näitajate määramiseks minna vaja satelliitloomi. Muude loomade kui näriliste uurimisel võetakse proovid väiksemalt arvult loomadelt (koerte uurimisel näiteks neljalt loomalt kummagi soo ja iga rühma kohta) vahepealsetel proovivõtu aegadel ja uuringu lõpus, nagu on kirjeldatud näriliste puhul. Kui võrreldavate doositasemetega tehtud varasema 90-päevase uuringu vältel ei tuvastatud mõju kliinilise biokeemia parameetritele, ei ole kolme kuu möödumisel vaja mõt-misi teha ei näriliste ega muude loomade puhul. Enne vereproovi võtmist on soovitatav loomi (v.a hiired) öö jooksul näljutada. Tuleks uurida järgmisi parameetreid (30): glükoos, karbamiid (karbamiidämmastik), kreatiin, üldvalk, albumiin, kaltsium, naatrium, kaalium, üldkolesterool, vähemalt kaks sobivat hepatotsellulaarse hindamise katset (alaniinaminotransferaas, aspartaataminotransferaas, glutamaatdehüdrogenaas, sapphapete kogusisaldus) (31) ja vähemalt kaks sobivat hepatobiliaarse hindamise katset (aluseline fosfataas, γ -glutamüültransferaas, 5²-nukleotidaas, üldbilirubiin, sapphapete kogusisaldus) (31). Muid kliinilisi keemilisi parameetreid, näiteks triglütseriide paastutingimustes, teatavaid hormoone ja koliinesteraasi võib mõõta vastavalt vajadusele, olenevalt uuritava kemikaali mürgisusest. Üldiselt on vaja paindlikku lähenemisviisi sõltuvalt uuritava kemikaali täheldatud ja/või oletatavast mõjust.

▼ **M4**

43. Uriinianalüüsi näitajad tuleks määrata vähemalt kümnel isas- ja kümnel emasloomal rühma kohta proovidest, mis on kogutud samade vahemikega kui hematoloogia- ja kliinilise keemia proovid. Kui võrreldavate doositasetega tehtud varasema 90-päevase uuringu ajal ei leitud uriinianalüüsil mingit mõju, ei ole kolme kuu möödumisel vaja mõõtmisi teha. Kliinilise patoloogia uuringute eksperdi soovitus (30) kohaselt tuleks määrata järgmised parameetrid: välimus, ruumala, osmolaalsus või suhteline tihedus, pH, üldvalk ja glükoos. Lisaks võib määrata ketoone, urobilinogeeni, bilirubiini ja peitverd. Kui täheldatud mõju on vaja laialdasemalt uurida, võib vajaduse korral määrata täiendavaid näitajaid.
44. Üldiselt arvatakse, et hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia näitajate lähteväärtused on vaja enne kemikaali manustamist määrata koertega tehtavate uuringute puhul, kuid närilistega tehtavate uuringute puhul neid määrata vaja ei ole (30). Kui varem määratud lähteväärtused (vt punkt 50) ei ole õiged, tuleks kaaluda selliste väärtuste määramist.

Patoloogia*Täielik lahkamine*

45. Kõik uuringus kasutatud loomad läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki avasid, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisaldist. Siiski võib ka ette näha, et mõõtmised piirduvad (vahepeal surmatud või satelliitrühma loomade puhul) kõige olulisemate, näiteks neurotoksilisuse või immunotoksilisuse näitajate määramisega (vt punkt 19). Selliseid loomi ei ole vaja lahata ja nendega teha järgmistest punktides kirjeldatud protseduure. Kontroll-loomade puhul võib uuringu juht konkreetsel juhul otsustada, kas lahkamine on vajalik.
46. Kõikide loomade puhul, v.a loomad, kellele on tehtud erand punkti 45 viimase osa järgi, tuleks määrata organite mass. Kõigi loomade (välja arvatud loomad, kes leitakse suremas ja/või surmataks uuringu kestel) neerupealised, aju, munandimanused, süda, neerud, maks, munasarjad, põrn, munandid, kilpnääre (mis kaalutakse pärast fikseerimist koos kõrvalkilpnäärmetega) ja emakas tuleks puhastada kõigist nende küljes olevatest kudedest, nagu on asjakohane, ja kaaluda märjalt võimalikult kiiresti pärast lahkamist, et vältida organite kuivamist. Uuringus, kus kasutatakse hiiri, ei ole neerupealiste kaalumise kohustuslik.
47. Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu (vt punkt 32) seisukohast kõige sobivamas fikseerimiskeskonnas (kandilistes sulgudes esitatud organite uuring ei ole kohustuslik):

Kõik silmaga nähtavad kahjustused	Süda	Kõhunääre	Magu (eesmagu, mao näärmeeline osa)
Neerupealised	Niudesool	Kõrvalkilpnääre	[Hambad]
Aort	Tühisooll	Perifeerne närv	Munandid
Aju (sh suuraju osad, väikeaju ning piklikaju/ajusild)	Neerud	Ajuripats	Harknääre
Umbsool	Pisaranääre (eksorbitaalne)	Eesnääre	Kilpnääre
Emakakael	Maks	Pärasool	[Keel]

▼ **M4**

Koagulatsiooninääre	Kops	Süljenääre	Hingetoru
Käärsool	Lümfisõlmed (nii pealispinnalt kui ka sügavalt)	Seemnepõiekesed	Kusepõis
Kaksteistsõrmiksool	Piimäärmed (kohustuslikud emaste puhul ja kui need on nähtavalt lõigatavad, siis ka isaste puhul)	Skeletilihased	Emakas (sh emakakael)
Munandimanus	[Ülemised hingamisteed, sh nina, ninakarbikud ja ninakõrvalkoopad]	Nahk	[Kusejuha]
Silm (sh võrkkest)	Söögitoru	Seljaaju (kolmel tasandil: kaela-, rinna- ja nimmepiirkond)	[Kusiti]
[Reieluu koos liigesega]	[Haistmissibul]	Põrn	Tupp
Sapipõis (muud liigid kui rott)	Munasarjad	[Rinnak]	Luuüdi lõige ja/või värske luuüdi aspiraati
Harderi nääre			

Paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks säilitada mõlemad organid. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Säilitada tuleks ka muud organid, mis uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt võivad tõenäoliselt olla sihtorganid. Nahakaudse manustamise uuringute puhul tuleks säilitada need organid, mis on ette nähtud suukaudse manustamise puhul, ja ülioluline on manustamiskohast nahaproovide võtmine ja säilitamine. Inhalatsiooniuuringute korral tuleks hingamisteedest säilitatavate ja uuritavate kudede puhul järgida käesoleva lisa peatükkide B.8 (8) ja B.29 (9) soovitusi. Muude organite/kudede puhul (ja lisaks hingamisteedest pärit konkreetselt säilitatavatele kudede) tuleks järgida suukaudse manustamise puhul esitatud organite nimekirja.

Histopatoloogia

48. On avaldatud juhendid toksikoloogilise patoloogia uuringute tegemise parimate tavade kohta (32). Tuleb teha vähemalt järgmised histopatoloogilised uuringud:

- suure annuse ja kontrollrühmade loomade kõik koed;
- uuringu vältel surnud või surmatud loomade kõik koed;
- kõik koed, milles täheldatakse makroskoopilisi anomaaliaid;
- sihtkoed või koed, mille puhul suure annuse rühmas on näha kokkupuutest tingitud muutusi, kõikidelt suure annuse rühmade loomadelt;
- paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks uurida mõlemat organit.

▼ **M4****KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmed**

49. Kõigi hinnatavate parameetrite kohta tuleks esitada iga looma andmed. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, katse ajal surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arv, mürgistusnähtudega loomade arv, täheldatud mürgistusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgise toime ilmumine, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik ja iga liiki kahjustuse kohta nende loomade protsent, kellel seda esines. Kokkuvõtlikes tabelites tuleks esitada (pidevalt mõõdetud katseandmete puhul) nende loomade keskmised ja standardhälbed, kellel täheldati mürgisuse mõju või kahjustusi, lisaks kahjustuse raskusastme määramisele.
50. Varasemad kontrolli andmed võivad aidata uuringu tulemusi tõlgendada, näiteks kui samaaegse kontrolli andmed erinevad oluliselt sama katsekorralduse juures kontrollrühma loomadelt saadud hiljutistest andmetest. Hindamiseks võetud varasemad kontrolli andmed peaksid pärinema samast laborist, olema saadud sama vanuserühma ja sama liini loomadega ning olema kogutud kõnealusele uuringule eelneva viie aasta jooksul.
51. Võimaluse korral tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohase ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Statistilised meetodid ja analüüsitavad andmed tuleks valida uuringu kavandamise etapis (punkt 8). Sellisel valimisel tuleks vajaduse korral ette näha, et tulemusi tuleb kohandada ellujäämise määra arvestamiseks.

Katseprotokoll

52. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

- füüsikaline olemus, puhtus ja füüsikalise-keemilised omadused;
- tunnusandmed;
- kemikaali päritolu;
- partii number;
- keemilise analüüsi sertifikaat.

Kandeaine (vajaduse korral):

- kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

Katseloomad:

- kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;
- loomade arv, vanus ja sugu katse alguses;

▼ **M4**

— päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

— iga looma kehamass katse alguses.

Katsetingimused:

— manustamistee ja doosi valiku põhjendus;

— kui see on kohaldatav, siis andmete analüüsimiseks valitud statistilised meetodid;

— andmed uuritava kemikaali preparaadi/sööda valmistamise kohta;

— analüüsiandmed preparaadis saavutatud kontsentratsiooni, preparaadi stabiilsuse ja homogeensuse kohta;

— manustamistee ja uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— inhalatsiooniuringute puhul: kas manustamine toimub ainult nina või kogu keha kaudu;

— tegelik doos (mg kehamassi kg kohta päevas) ja vajaduse korral ümberarvestustegur söödas või joogivees oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (mg/kg või ppm) ja tegeliku doosi vahel;

— sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad.

Tulemused (tuleks esitada kokkuvõtlikud tabelandmed ja andmed eraldi iga looma kohta):

— ellujäämuse andmed;

— kehamass / kehamassi muutused;

— sööda tarbimine, söödakasutuse tõhususe arvutused (kui need tehti) ja vee tarbimine (kui on kohaldatav);

— toksilise mõju andmed vastavalt looma soole ja doositasemele, sealhulgas mürgistusnähud;

— kliiniliste ilmingute laad, esinemissagedus (ja kui määrati, siis raskuste) ning kestus (sõltuvalt sellest, kas nähud on mööduvad või püsivad);

— oftalmoloogiline läbivaatus;

— hematoloogilised analüüsid;

— kliinilise biokeemia analüüsid;

— uriinianalüüsid;

— neurotoksilisuse või immunotoksilisuse uuringute tulemused;

— kehamass surmamisel;

— organite mass (ja kui võimalik, siis organi massi / kehamassi suhe);

— lahkamise leiud;

— kõigi kemikaaliga kokkupuutest tingitud histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;

— võimaluse korral andmed imendumise kohta.

▼ **M4**

Vajaduse korral tulemuste statistiline töötlus.

Tulemuste arutelu:

- mõju sõltuvus doosist;
- võimalikku toimeviisi käsitleva teabe analüüsimine;
- võimaliku modelleerimislähenemisviisi arutelu;
- võrdlusdoosi (BMD), täheldatava kahjuliku toimeta doosi (NOAEL) või vähima täheldatava kahjuliku toimega doosi (LOAEL) kindlaksmääramine;
- varasemad kontrolli andmed;
- asjakohasus inimeste puhul.

Järeldused

KIRJANDUS

- 1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- 2) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.
- 3) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW *et al.* (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40, 145–191.
- 4) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.
- 5) Käesoleva lisa peatükk B.27 „Subkroonilise suukaudse toksilisuse katse – suukaudse kordusdoosi toksilisuse 90-päevane uuring mittenäriistel”.
- 6) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.
- 7) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- 8) Käesoleva lisa peatükk B.8 „Subakuutne mürgisus sissehingamisel: 28-päevane uuring”.
- 9) Käesoleva lisa peatükk B.29 „Subkrooniline mürgisus sissehingamisel: 90-päevane uuring”.
- 10) Käesoleva lisa peatükk B.9 „Kordusdoosi mürgisus (28 päeva, naha-kaudne)”.
- 11) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. Critical Reviews in Toxicology 36: 1–7.
- 12) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. Critical Reviews in Toxicology 36: 9–35.
- 13) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. Critical Reviews in Toxicology 36: 37–68.

▼ **M4**

- 14) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69–98.
- 15) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- 16) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- 17) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729–837.
- 18) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- 19) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 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 DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999–1003.
- 26) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691–704.
- 27) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267–283.
- 28) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233–236.
- 29) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599–609.

▼ **M4**

- 30) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & 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**

1. liide

MÕISTE

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼B

B.31. SÜNNIEELSE ARENGU MÜRGISUSE UURIMUS

1. MEETOD

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 414 (2001).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev arenguaegse mürgisuse uurimise meetod on välja töötatud selleks, et pakkuda üldist teavet sünnieelse kokkupuute mõjude kohta tiinetel katseloomadel ja emakas areneval organismil; see võib hõlmata nii emalt pärinevat mõjude kui ka surma, struktuursete kõrvalekallete või loote muundunud arengu hindamist. Funktsionaalsed puudujäägid, mis on arengu tähtis osa, ei ole käesoleva testi lahutamatu osa. Neid võib uurida eraldi uurimuses või käesoleva uurimuse täiendusena, kasutades neurotoksilisuse uuringutele suunatud katsemeetodit. Funktsionaalsete puudujääkide ja muude sünnijärgsete mõjude uurimist käsitleva teabe puhul tuleks vajadusel pidada nõu kahe põlvkonna reproduktiivse mürgisuse uuringut ja arengulise neurotoksilisuse uuringut käsitleva katsemeetodi üle.

Käesolev katsemeetod võib eeldada konkreetset kohandamist üksikjuhtudel spetsiaalsete, nt katseaine füüsikalise-keemilise või toksikoloogilise omadusi puudutavate teadmiste põhjal. Selline kohandamine on aktsepteeritav, kui on olemas veenvad teaduslikud tõendid, et kohandamise tõttu on katse informatiivsem. Sellisel juhul tuleks hoolikalt dokumenteerida uurimisprotokollis nimetatud teaduslikud tõendid.

1.2. MÕISTED

Arengutoksikoloogia – selliste areneva organismi kahjulike mõjude uuring, mis võivad tuleneda kokkupuutest enne viljastumist, sünnieelse arengu ajal või sünnijärgselt kuni seksuaalse küpsuse eani. Arengutoksikoloogia peamised ilmingud on järgmised: 1) organismi surm, 2) struktuursete kõrvalekalded, 3) muundunud kasv ja 4) funktsionaalsed puudujäägid. Arengutoksikoloogiale viidati varem sageli kui teratoloogiale.

Kahjulik mõju – selline töötlemisega seotud muutus algtasemest, mis vähendab organismi võimet ellu jääda, sigida või kohaneda keskkonnaga. Võttes arvesse arengutoksikoloogiat, oma kõige laiemas tähenduses sisaldab see mis tahes mõju, mis segab viljastamise tulemuse normaalset arengut nii enne kui ka pärast sündi.

Muundunud areng – järglase organi või keha kaalu või suuruse muutumine.

Muundumised (anomaaliad) – struktuursete muundumised, mis hõlmavad nii väärarenguid kui ka muutusi (28).

Väärareng/suur kõrvalekalle – struktuursete muutus, mida peetakse loomale kahjulikuks (võib olla samuti surmav) ja mida juhtub tavaliselt harva.

▼B

Muutus/väike kõrvalekalle – struktuuriline muutus, millel on vähe või ei ole üldse kahjulikku mõju loomadele; võib olla ajutine ja võib esineda suhteliselt sagedasti kontrollpopulatsioonis.

Viljastumise tulemus (*conceptus*) – viljastunud munaraku derivaatide summa arengu igal etapil viljastumisest kuni sünnini, kaasa arvatud lootevälised kestad ning embrüo või loode.

Implantatsioon (nidatsioon) – lootepõiekesse kinnitumine emaka epiteelkoele, kaasa arvatud selle tungimine läbi emakaepiteeli, ning selle kinnitumine emakalimaskestale.

Embrüo – organismi varane või arengustaadium, eelkõige munaraku viljastumise tulemus pärast pikitelje ilmumist ja seni, kuni kõik suuremad struktuurid on olemas.

Embrüotoksilisus – embrüo tavalist struktuuri, arengut, kasvu ja/või elujõulisust kahjustav.

Loode – sündimata järglane embrüojärgsel perioodil.

Lootetoksilisus – loote tavalist struktuuri, arengut, kasvu ja/või elujõulisust kahjustav.

Abort – viljastumise tulemuse (embrüo või mitteelujõulise loote) enneaegne väljumine emakast.

Resorptsioon – viljastumise tulemus (*conceptus*), kes pärast emakasse istutamist sureb või resorbeerub või on resorbeerunud.

Varajane resorptsioon – tõendid implantatsiooni kohta ilma äratuntava embrüo/looteta.

Hiline resorptsioon – surnud embrüo või väliste degeneratiivsete muutustega loode.

NOAEL – lühend sõnadest „no observed adverse effect” – täheldamata kahjuliku mõju tase. See on kõrgeim annus- või kokkupuute-tase, kus ei ole täheldatud kahjulikke, töötlemisega seotud leide.

1.3. VÕRDLUSAINE

Puudub.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Tavaliselt manustatakse katseainet tiinetele loomadele vähemalt alates implantatsioonist kuni ühe päevani enne ettemääratud tapmist, mis peaks olema niipalju kui võimalik tavalise sünnitustähtaja lähedal, et ei läheks andmed kaduma varase sünnituse tõttu. Katsemeetod ei ole mõeldud ainult uurima organogeneesi perioodi (nt närilistel 5.–15. päev ja küülikutel 6.–18. päev), vaid samuti kogu tiinusperioodi aegseid mõjusid alates enne implantatsiooni ja lõppedes päev enne keisrilõiget. Natuke enne keisrilõiget emasloomad tapetakse, emakasisu uuritakse ning loodetele antakse hinnang väliselt nähtavate anomaaliate kohta ning pehme koe ja skeletimuutuste kohta.

▼B

1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.5.1. Loomaliikide valik

On soovitatav, et katse tehtaks kõige sobivamate liikidega ja et kasutataks laboriliike ja -liine, mida tavaliselt kasutatakse sünnieelse arengutoksilisuse uurimiseks. Eelistatud näriliste liik on rott ja eelistatud muude kui näriliste liik on küülik. Tuleks põhjendada seda, kui kasutatakse muid liike.

1.5.2. Loomade pidamise ja toitmise tingimused

Loomade katseruumi temperatuur peaks närilistel olema 22 °C (\pm 3°) ja küülikutel 18 °C (\pm 3°). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal, siis eesmärk on hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Toitmisel võib kasutada tavapärast labori toiduvalikut koos piiramatu hulga joogiveega.

Paaritumine peab toimuma selleks ettenähtud puurides. Kuna pairitunud loomade puhul eelistatakse eraldi hoidmist, on samuti lubatud väikesearvulistes rühmades hoidmine.

1.5.3. Loomade ettevalmistamine

Tuleks kasutada terveid loomi, kes on harjutatud laboritingimustega vähemalt viis päeva ja keda ei ole varem katsetes kasutatud. Katseloomade liik, liin, päritolu, sugu, kaal ja/või vanus on äratuntavad. Kõikide katserühmade loomad peaksid niipalju kui võimalik olema ühesuguse kaalu ja vanusega. Noori täiskasvanud ja sünnitamata emasloomi tuleks kasutada iga annusmäära juures. Emasloomad tuleks paaritada sama liigi ja liini isasloomadega ning õdede-vendade paaritamist tuleks vältida. Näriliste puhul on tiinuse 0- päevaks päev, mil tupekorki ja/või spermat jälgiti; küülikute puhul on 0-päev tavaliselt suguühte või kunstliku viljastamise päev, kui kasutatakse sellist tehnikat. Pairitunud loomad määratakse erapooletult kontroll- või töödeldavatesse rühmadesse. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Igale loomale tuleks anda ainulaadne tunnusnumber. Pairitunud emasloomad tuleks erapooletult jagada kontroll- või töödeldavatesse rühmadesse ning kui emasloomi paaritatakse partiides, tuleks iga partii loomad jaotada ühtlaselt rühmade vahel. Samamoodi tuleks sama isaslooma poolt viljastatud emasloomad jagada ühtlaselt rühmadesse.

1.6. KATSE KÄIK

1.6.1. Loomade arv ja sugu

Igas katse- ja kontrollrühmas peaks olema piisaval hulgal emasloomi, et lahanguks saadakse ligikaudu 20 emaslooma, kellel täheldatakse implantatsiooni. Rühmad, kus on alla 16 sellise looma, ei ole sobivad. Emade suremus ei pruugi tunnistada kehtetuks uurimist, tingimusel et see ei ületa 10 %.

▼B**1.6.2. Annuste valmistamine**

Kui kandeainet või lisandit kasutatakse manustamise lihtsustamiseks, arvesse tuleks võtta järgmisi omadusi: katseaine absorptsiooni, jaotamist, metabolismi ja peetumist või eritumist käsitlevad mõjud; katseaine keemilisi omadusi käsitlevad mõjud, mis võivad muuta toksilisi omadusi; ning toidu- või veetarbimist või toitumust käsitlevad mõjud. Kandeaine ei tohiks olla arengust lähtuvalt mürgine ega mõjutada reproduktsiooni.

1.6.3. Annustamine

Tavaliselt katseainet manustatakse iga päev alates implantatsioonist (nt 5. päev pärast paaritumist) kuni päevani enne kavandatud keisriloiget. Kui esialgsed uurimused vajaduse korral ei viita preimplantatsiooni kaotuse kõrgele riskile, võib ravi pikendada kuni kogu tiinusperioodini paaritumiste ja ettekavandatud tapmiseni. On hästi teada, et ebasobiv käsitlemine või tiinusaegne stress võivad viia loote kaotuseni. Et vältida lootekaotust muude kui katsega seotud tegurite poolt, tiinete loomade tarbetu käsitlemine ning stress välistest teguritest, nagu näiteks müra, tuleks vältida.

Tuleks kasutada vähemalt kolme annusmäära ja teha samaaegselt kontrolli. Paaritunud loomad jagatakse erapooletult kontroll- või töödeldavatesse rühmadesse. Annusmäärade vahemikud määratakse nii, et saaks hinnata toksilisi mõjusid. Kui katseaine füüsikaliskemiline laad või bioloogilised omadused ei sea piiranguid, valitakse kõrgeim annus eesmärgiga põhjustada mõningat arengu- ja/või emale suunatud mürgisust (kliinilised nähud või kehakaalu väheneamine), kuid mitte surma või tõsiseid kannatusi. Vähemalt üks vahepealne annusmäär tekitab minimaalseid täheldatavaid toksilisi mõjusid. Väikseima annusmäära puhul ei tohiks emale suunatud või arengutoksilisust ilmned. Tuleks valida annusmäärade alanev järjestus, et näidata annusega seotud reaktsiooni ja mittetäheldatud kahjuliku mõju taset (NOAEL). Kahe- või neljakordsed vahemikud on sageli optimaalsed alanevate annusmäärade kehtestamisel ja sageli on eelistatav neljanda katserühma lisamine väga suurte vahemike (nt üle kümnekordne tegur) annuste vahel. Kuigi eesmärgiks on määrata ema täheldamata kahjulikud mõjud, kiideti samuti heaks uuringud, kus sellist vahemikku ei kasuta (1).

Annusmäärad tuleks valida, võttes arvesse olemasolevaid andmeid mürgisuse kohta ning ka lisateavet katseaine või samalaadse aine metabolismi ja toksikokineetika kohta. Käesolev teave aitab samuti viidata sellele, et annustamisrežiim on adekvaatne.

Tuleks kasutada samaaegset kontrollrühma. Nimetatud rühmaks on võltskontrollrühm (platseebot saav kontrollrühm) või kandeainet saav kontrollrühm, kui kandeainet kasutatakse katseaine manustamisel. Kõikidele rühmadele tuleks manustada sama kogus kas katseainet või kandeainet. Kontrollrühma(de) loomi tuleks kohelda nii nagu katserühma loomi. Kandeainet saavatele kontrollrühmadele tuleks anda suurim kogus kasutatud kandeaineid (madalaim katserühm):

▼B**1.6.4. Piirsalduskatse**

Kui suukaudne annusmäär on vähemalt 1 000 mg kg kehakaalu kohta päevas, kasutades käesolevas uurimuses kirjeldatud menetlusi, täheldatavat mürgisust põhjustamata, kas tiinetel loomadel ja/või nende järglastel ning kui mõju eeldatavasti ei põhine olemasolevatel andmetel (nt struktuuriliselt ja/või metaboolselt samalaadsed ühendid), siis ei peeta vajalikuks kolme annusmäära kasutatavat täielikku uurimust. Inimeste ootuspärane vastuvõtlikkus võib viidata piirkatses kasutatavatest annustest suuremate suukaudsete annuste kasutamise vajadusele. Muude manustamisviiside puhul, nagu näiteks sissehingamine või nahakaudne kasutamine, võivad katseaine füüsikalised-keemilised omadused tihti viidata ja piirata suurimat saavutatava kokkupuutumise ulatusega (nt nahakaudne kasutamine ei põhjusta rasket paikset mürgisust).

1.6.5. Annuste manustamine

Katseainet või kandeained manustatakse tavaliselt suu kaudu intubeerimise teel. Kui kasutatakse muud manustamisviisi, peaks katse tegija põhjendama selle valikut ja asjakohased muutused võivad olla vajalikud (2, 3, 4). Katseainet tuleks manustada ligikaudu samal ajal iga päev.

Üksikute loomade annus peab tavaliselt põhinema kõige viimasel ühe looma kehakaalu kindlaksmääramisel. Annuse määramisel tuleks siiski olla ettevaatlik tiinuse viimasel trimestril. Varasemaid andmeid tuleks kasutada annuse valimisel, et vältida liigset emale suunatud mürgisust. Kui liigset mürgisust on täheldatud käsitletud emasloomadel, tuleks need loomad humaanselt tappa. Kui mitmetel tiinetel loomadel on liigse mürgisuse nähud, tuleks kaaluda nimetatud annusrühma lõpetamist. Kui aineid manustatakse sundsöötmise teel, peaks see olema eelistatult ühekordne annus loomadele söögitoru kaudu või sobiva intubeerimise kanüüli abil. Vedeliku suurim kogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suuruselt. Maht ei tohiks ületada 1 ml 100 g kehakaalu kohta, välja arvatud vesilahuste puhul, kui võib kasutada mahtu 2 ml 100 g kehakaalu kohta. Kui kandeainena kasutatakse maisiõli, ei tohiks selle maht ületada 0,4 ml 100 g kehakaalu kohta. Katsekoguse muutlikkust tuleks vähendada, kohandades kontsentratsioone konstantse koguse tagamiseks kõikidel annusmääradel.

1.6.6. Emasloomade jälgimine

Kliinilised vaatlused tuleks teha ja registreerida vähemalt üks kord päevas, soovitavalt sama ajal iga päev, võttes arvesse pärast annustamist oodatavate mõjude kõrgeperioodi. Loomade seisund tuleks registreerida, kaasa arvatud suremus, haigestumus, asjassepuutuvad käitumismuutused ning kõik selge mürgisuse nähud.

1.6.7. Kehakaal ja toidu tarbimine

Loomi tuleks kaaluda tiinuse 0-päeval ja mitte hiljem kui tiinuse 3. päeval, kui kasutatakse välise aretaja tarnitud aegpaaritud loomi, annustamise esimesel päeval, vähemalt iga kolme päeva tagant annustamisperioodil ja ettemääratud tapmise päeval.

▼B

Toidu tarbimist tuleks registreerida kolmepäevaste ajavahemike tagant ja see peaks kokku langema kehakaalu kindlaksmääramisega.

1.6.8. Tapajärgne uurimine

Emasloomad tuleks tappa päev enne oodatavat sünnitustähtpäeva. Emasloomad, kellel ilmnevad abordi või enneaegse sünnituse nähud enne ettemääratud tapmiskuupäeva, tuleks tappa ja neile tehakse põhjalik makroskoopiline uuring.

Lõpetamise ajal või uurimise käigus aset leidnud surma korral tuleks uurida emaslooma makroskoopiliselt igasuguste struktuuriliste kõrvalekallete või patoloogiliste muutuste osas. Emasloomade hindamine keisrilõike ajal ja sellele järgnevad looteanalüüsid tuleks teha soovitatavalt teadmata, millisesse rühma emasloom kuulub, et vähendada süstemaatilist viga.

1.6.9. Emakasisu uurimine

Vahetult pärast lõpetamist või nii kiiresti kui võimalik pärast surma tuleks emakas eemaldada ja kinnitada loomade tiinust. Emakat, mis ei ole tiine, tuleks edasi uurida (nt näriliste puhul ammooniumsulfiidiga värvimisega ja Salewski värvimisega või muu sobiva meetodiga küülkute puhul), et kinnitada tiinuse puudumist (5).

Tiine emakas, kaasa arvatud emakakael, tuleks ära kaaluda. Tiine emaka kaalu ei tohiks saada loomadelt, kes surid katse käigus.

Kollakehade arv tuleks kindlaks määrata tiinete loomade puhul.

Emakasisu tuleks uurida mitmete embrüo- või lootesurmade suhtes ja elujõuliste loodete suhtes. Resorptsiooni ulatust tuleks kirjeldada, et hinnata *conceptus*'e surma suhtelist aega (vt punkti 1.2).

1.6.10. Loodete uurimine

Iga loote sugu ja kehakaal tuleks kindlaks määrata.

Iga loodet uuritakse väliste muundumiste suhtes (6).

Looteid uuritakse skeleti- ja pehmekoe muundamiste osas (nt muutused ja väärarengud või anomaaliad) (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24). Loote muunduste liigitamine on soovitatav, kuid mitte nõutav. Kui liigitamine on tehtud, tuleks selgesti sõnastada iga kategooria kindlaks määramise kriteeriumid. Erilist tähelepanu tuleks pöörata reproduktiivorganile, mida tuleks uurida muundunud arengu tunnuste suhtes.

Närilistel ligikaudu pool pesakonnast valmistatakse ette skeletimuundumiste uurimiseks. Ülejäänud pesakond valmistatakse ette pehmekoe muundumiste uurimiseks, kasutades heakskiidetud või sobivat mikrotoommenetlust või hoolsat dissekteerimistehnikat.

▼B

Muude kui näriliste puhul, nt küülikud, tuleks uurida kõiki looteid nii pehmekoe- kui ka skeletimuutuste suhtes. Nende loodete kehasid hinnatakse hoolsa dissekteerimise abil pehmekoemuutuste osas, mis võivad hõlmata jätkumenetlusi südame sisestruktuuri (25) hindamiseks. Pooltel, selliselt uuritud loodetel eemaldatakse pead, mille pehmekoemuutusi (sh silmad, aju, ninaõõned ja keel) uuritakse tavaliise mikrotoommenetluse abil (26) või võrdselt tundliku meetodi abil. Nende loodete kehad ja ülejäänud looted, keda ei ole uuritud, prepa-reeritakse skeletimuutuste uurimise tarbeks, kasutades samu meeto-deid nagu näriliste puhul.

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Andmed edastatakse iga emaslooma ja nende järglase kohta tabeli kujul, näidates iga katserühma ja põlvkonna kohta loomade arvu katse alguses, katse käigus surnud või humaansetel kaalutlustel tapetud loomade arvu, surma ja humaanse tapmise ajad, tiinete emasloomade arvu, mürgisuse nähtudega loomade aru, mürgisuse nähtude kirjelduse, sh toksiliste mõjude algusaja, kestuse ja raskuse, embrüot/loodet käsitlevate vaatluste liigid ja kogu asjaomane teave pesakonna kohta.

Numbrilisi tulemusi hinnatakse asjaomase statistilise meetodi abil, kasutades andmeanalüüsi üksusena pesakonda. Kasutatakse üldiselt heakskiidetud statistilist meetodit; statistilised meetodid tuleks valida uurimuse kavandamisel ja neid tuleks põhjendada. Andmed loomadest, kes ei ela ettemääratud tapmiseni, tuleks samuti edastada. Nimetatud andmed võivad sisalduda rühmakeskmiste hulgas vajaduse korral. Sellistelt loomadelt saadud andmete olulisus ja seetõttu nende sisaldumist rühmakeskmis(t)e hulgas või sealt väljajätmist tuleks põhjendada ja hinnata üksikhaaval.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE

Sünnieelse arengutoksilisust käsitleva uurimuse avastusi hinnatakse vaadeldud mõjude tähenduses. Hindamine peab hõlmama järgmist teavet:

— ema ja embrüot/loodet uuriva katse tulemused, sh loomade katseainega kokkupuute ning kõikide avastuste esinemise ja raskuse vahelise seose või selle puudumise hindamine;

— loote väliste muutuste, pehmekoe- ja skeletimuutuste liigitamisel kasutatavad kriteeriumid, kui liigitamist on kasutatud;

▼B

- vajaduse korral ajaloolised kontrollandmed katsetulemuste tõlgendamise tõhustamiseks;
- kõikide protsendimäärade või indeksite arvutamisel kasutatud arvud;
- vajaduse korral katseavastuste piisav statistiline analüüs, mis peaks sisaldama piisavalt teavet analüüsimeetodi kohta, nii et sõltumatu arvustaja/statistik saaks uuesti hinnata ja rekonstrueerida analüüsi.

Igas katses, mis tõendab toksiliste mõjude puudumist, tuleks kaaluda jätkuuringi katseaine absorptsiooni ja biosaadavuse kindlaksmääramiseks.

2.3. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Sünnieelset arengutoksilisust käsitlev katse annab teavet emasloomade korduva ainega kokkupuute kohta tiinuse ajal ja nende järglase üsasisese arengu kohta. Katse tulemusi tõlgendatakse koostoimes subkroonilisel, reproduktsiooni, toksikokineetilisel ja muudel katsetel saadud avastustega. Kuna rõhutatakse nii üldist mürgisust emale mõjuva mürgisuse tähenduses kui ka arengutoksilisuse lõpp-punkte, võimaldavad katsetulemused mingis teatud ulatuses vahetegemist üldise toksilisuse puudumisel asetleidvate arengumõjude ja nende arengumõjude vahel, mis on tekkinud tasemetel, mis on samuti emasloomale (27) mürgised.

3. ARUANDLUS

3.1. KATSEARUANNE

Katseprotokoll peab sisaldama järgmist teavet.

Katseaine:

- füüsiline laad ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;
- tunnusandmed, kaasa arvatud CASi number, kui see on teada/-kasutusel;
- puhtus.

Kandaine (vajadusel):

- kandaine valiku põhjendus, kui see on muu kui vesi. Katseloomad:

kasutatud liigid ja liinid;

- loomade arv ja vanus;
- päritolu, elamistingimused, toitumine jne;
- iga looma kaal katse alguses.

— Katsetingimused:

annuste valiku põhjendus;

- katseaine valmistamise/toiduvalmistise üksikandmed, saavutatud kontsentratsioon, valmistise stabiilsus ja homogeensus;
- katseaine manustamise üksikasjad;

▼B

— toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) muutmine tegelikuks annuseks (mg/kg kehakaalu kohta päevas) vajaduse korral;

— keskkonnatingimused;

— üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta.

— Tulemused

Andmed emaslooma mürgisele annusele reageerimise kohta,

sealhulgas:

— loomade arv katse alguses, ellujäänud loomade arv, tiinete loomade arv ja katkenud tiinusega loomade arv, enneaegselt sünnitanud loomade arv;

— surmapäev katse ajal või andmed loomade ellujäämise kohta kuni lõpetamiseni;

— andmed loomade kohta, kes ei elanud kuni ettemääratud tapmiseni, edastatakse, kuid ei sisaldu rühmadevahelistes statistilistes võrdlustes;

— iga ebatavalise kliinilise tunnuse jälgimise päev ja selle edasiasia-
renemine;

— kehakaal, kehakaalu muutus ja tiine emaka kaal, sh valikuliselt kehakaalu muutus, mida on korrigeeritud tiine emaka kaalu võrra;

— toidu tarbimine ja, kui seda on mõõdetud, vee tarbimine;

— lahangu leiud, sh emaka kaal;

— edastatakse NOAEL-väärtused ema ja areneva loote kohta.

Arenguga seotud lõpp-punktid annuse järgi pesakonna kohta, kellel on implantaadid, kaasa arvatud:

— kollakehade arv;

— implantatsioonide arv, elus ja surnud loodete ning resorptsioonide arv ja protsent;

— implantatsioonieelsete või -järgsete tiinuste katkemise arv ja protsent.

Arenguga seotud lõpp-punktid annuse järgi pesakonna kohta, kus on elus looted, kaasa arvatud:

— elus järglaste arv ja protsent;

— sooline jagunemine;

— loote kehakaal, soovitavalt soo järgi ja kombineeritud mõlema sooga;

— väliste, pehmekoe- ja skeletiväärarengud ning muud asjaomased muutused;

— liigitamise kriteeriumid vajaduse korral;

▼B

— loodete ja selliste pesakondade koguarv ja protsent, kellel on välised, pehmekoe- või skeletimuutused ning individuaalsete anomaaliate ja muude asjaomaste muutuste liigid ja esinemine.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

- 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. (19 9 7) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CUT 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 für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247:367.
- 6) Edwards, J.A. (19 6 8) 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 Technique for 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. (19 74) Prenatal Ossification in Rabbits ss Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313-320.
- 13) Gibson, J.P. et al. (19 6 6) 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. KANTSEROGEENSUSE UURINGUD

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 451 (2009). Esialgne kantserogeensuse uuringuid käsitlev katsejuhend TG 451 võeti vastu 1981. aastal. Käesoleva läbivaadatud katsemeetodi B.32 koostamist peeti vajalikuks, et võtta arvesse hiljutist arengut loomade heaolu ja regulatiivsete nõuete valdkonnas (2, 3, 4, 5, 6). Käesolevat katsemeetodit B.32 on ajakohastatud paralleelselt käesoleva lisa peatüki B.30 („Kroonilise mürgisuse uuringud”) ja peatüki B.33 („Kombineeritud kroonilise mürgisuse/kantserogeensuse uuringud”) läbivaatamisega selleks, et saada uuringus kasutatavate loomade abil lisateavet ning esitada täpsemaid andmeid dooside valiku kohta. Käesolev katsemeetod B.32 on koostatud selleks, et kasutada seda mitmesuguste kemikaalide, sh pestitsiidide ja tööstuslike kemikaalide katsetamiseks. Siiski tuleks märkida, et mõned üksikasjad ja nõuded võivad ravimite puhul olla erinevad (vt rahvusvahelise ühtlustamiskonverentsi suunis S1B, mis käsitleb ravimite kantserogeensuse katsetamist).
2. Enamik kantserogeensuse uuringuid tehakse närliselikiididega ja käesolev katsemeetod on seega kavandatud peamiselt kasutamiseks nende liikidega tehtavate uuringute puhul. Kui kõnealuseid uuringuid on vaja teha muu loomaliigi kui närlistega, tuleks käesoleva katsemeetodi põhimõtteid ja toimimiskäiku kasutada koos nendega, mis on esitatud käesoleva lisa peatükis B.27 „Subkroonilise suukaudse toksilisuse katse – suukaudse kordusdoosi toksilisuse 90-päevane uuring mittenärlistel” (6) ja teha asjakohased muudatused. Täiendavad suunised on esitatud OECD juhenddokumendis nr 116, mis käsitleb kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute kavandamist ja tegemist (7).
3. Kantserogeensuse uuringutes kasutatavad kolm peamist manustamisteed on suukaudne, nahakaudne ja sissehingamise teel manustamine. Manustamisviisi valik sõltub uuritava kemikaali füüsilistest ja keemilistest omadustest ning inimeste peamisest võimalikust kokkupuuteviisist ainega. Lisateave kokkupuutete valimise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).
4. Käesolevas katsemeetodis on keskendutud suukaudsele manustamisele, mis on kantserogeensuse uuringutes enim kasutatav manustamistee. Kuigi inimeste tervist ohustavate riskide hindamiseks võivad vajalikud olla ka kantserogeensuse uuringud, mis hõlmavad nahakaudset või sissehingamise teel toimuvat kokkupuudet, ja/või neid võidakse nõuda teatavate eeskirjadega, on mõlema nimetatud kokkupuutete puhul katsete korraldamine tehniliselt keeruline. Kõnealused uuringud tuleb kavandada juhtumipõhiselt, kuigi siin suukaudse manustamise kantserogeensuse hindamiseks kirjeldatud katsemeetodi võib võtta aluseks sissehingamise teel ja/või nahakaudse manustamise uuringu katse-eeskirja koostamisel, arvestades soovitusi manustamise ajavahemike, kliiniliste parameetrite ja patoloogianäitajate jne kohta. Uuritavate kemikaalide nahakaudse (7) ja sissehingamise teel (7, 8) manustamise kohta on avaldatud OECD juhenddokumendid. Kui kavandatakse sissehingamise kaudu toimuvat kokkupuudet hõlmavaid pikaajalisi uuringuid, tuleks eelkõige vaadata käesoleva lisa peatükke B.8 (9) ja B.29 (10) koos sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse uurimist käsitleva OECD juhenddokumendiga (8). Nahakaudse manustamise katsete tegemise kohta tuleks vaadata käesoleva lisa peatükki B.9 (11).

▼M4

5. Kantserogeensuse uuring annab teavet võimalike terviseriskide kohta, mis võivad tõenäoliselt tekkida korduva kokkupuute korral kasutatava liigi kogu eluea jooksul. Uuringuga saadakse teavet uuritava kemikaali mürgiste mõjude, sealhulgas võimaliku kantserogeensuse kohta, võidakse teha kindlaks sihtorganid ja kemikaali akumulatsiooni võimalikkus. Sellega võidakse hinnata tähtsat kahjuliku toimet doosi taset toksilise mõju puhul ning mittegenotoksiliste kantserogeenide puhul kasvajate teket; saadud andmeid saab kasutada inimeste kokkupuute jaoks ohutuskriteeriumide kehtestamiseks. Samuti rõhutatakse vajadust teha loomade hoolikas kliiniline läbi-vaatus, et hankida võimalikult palju teavet.

6. Käesoleva katsemeetodi kohaste kantserogeensuse uuringute eesmärgid on järgmised:
 - uuritava kemikaali selliste kantserogeensete omaduste kindlakstegemine, mis põhjustavad uudismoodustiste arvu suurenemist, pahaloomuliste uudismoodustiste osakaalu suurenemist või uudismoodustiste tekkeni kuluva aja lühenemist, võrreldes samaaegsete kontrollrühmadega;
 - kantserogeense toime sihtorgani(te) tuvastamine;
 - uudismoodustiste tekkimiseni kuluva aja kindlakstegemine;
 - kasvajaid tekitava mõju doosist sõltuvuse kirjeldamine;
 - tähtsat kahjuliku toimet doositaseme (*no-observed-adverse-effect level*, NOAEL) või võrdlusdoosi (*Benchmark Dose*, BMD) kindlakstegemiseks lähtepunkti määramine;
 - kantserogeense toime ekstrapoleerimine inimeste madala doositasemega kokkupuutele;
 - andmete saamine toimeviisi käsitlevate hüpoteeside kontrollimiseks (2, 7, 12, 13, 14, 15).

LÄHTEKAALUTLUSED

7. Uuritava kemikaali võimalike kantserogeensete omaduste hindamisel peaks uurimislabor enne uuringu tegemist võtma arvesse kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, et uuringu kavandamisel keskenduda kantserogeense toime võimaluse kõige tõhusamale katsetamisele ja minimeerida loomade kasutamine. Teave eeldatava kantserogeeni toimeviisi kohta ja selle arvessevõtmine (2, 7, 12, 13, 14, 15) on eriti tähtis, kuna katse optimaalseks kavandamiseks võib olla vaja teada, kas uuritav kemikaal on teadaolev või eeldatav genotoksiline kantserogeen. Täpsemad juhendid toimeviisi arvestamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

8. Uuringu kavandamist hõlbustav teave hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalise-keemilised omadused; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse, sealhulgas genotoksilisuse katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed, mutageensus/genotoksilisus, kantserogeensus ja muud toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuriga ainete kohta; olemasolevad toksiko-kineetilised andmed (võimaluse korral ühekordse doosi ja kordusdoosi kineetika) ning muud korduva kokkupuute uuringutega saadud

▼ **M4**

andmed. Kantserogeensust tuleks uurida alles pärast esialgse mürgisust käsitleva teabe saamist korduvsuure 28-päevase ja/või 90-päevase mürgisuse katsest. Kasulikku teavet võivad anda ka lühiajalised vähi tekke ja arenemise katsed. Konkreetse uuritava kemikaali võimalike kahjulike tervise mõjude üldhindamisel tuleks kaaluda kantserogeensuse järkjärgulise uurimise lähenemisviisi (16, 17, 18, 19).

9. Enne uuringu alustamist tuleks uuringu kava ja eesmärkide alusel kindlaks määrata kõige sobivamad tulemuste analüüsi statistilised meetodid. Kaaluda tuleb seda, kas statistika peaks hõlmama ellujäämuse arvessevõtmist, katse ellujäämise kestusega seotud kasvajatekkete kumulatiivse riski analüüsi, kasvaja tekkimiseni kuluva aja analüüsi ning analüüsi tegemist ühe või mitme rühma kavandatust varasema surmamise korral. Suunised asjakohaste statistiliste analüüside tegemiseks ja peamised viited rahvusvaheliselt tunnustatud statistilistele meetoditele on esitatud juhenddokumentides nr 116 (7) ning nr 35, milles käsitletakse kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute analüüsi ja hindamist (20).

10. Kantserogeensuse uuringu tegemisel tuleks alati järgida suunispõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on sätestatud OECD juhenddokumendis nr 19 kliiniliste nähtude tuvastamise, hindamise ja kasutamise kohta ohutuse hindamisel kasutatavate katseloomade humaansete lõpetamiskriteeriumidena (21) ja eelkõige selle punktis 62. Kõnealusel punktis on sätestatud, et „[k]ui uuringutes, milles kasutatakse korduvat annustamist, tekivad loomal kliinilised progresseeruvad nähud, mis põhjustavad tema seisundi halvenemise, tuleb teha andmetel põhinev otsus, kas loom tuleks humaansel viisil surmata. Otsuse tegemisel tuleks kaaluda kõnealuse uuringu osaleva looma jätkuvast elushoidmisest saadava teabe väärtust võrreldes looma üldise seisundiga. Kui tehakse otsus kõnealune loom katsesse jätta, tuleks vajaduse korral suurendada vaatluste sagedust. Ilma katse eesmärki kahjulikult mõjutamata võib samuti olla võimalik annustamise ajutine peatamine, kui see vähendab looma valu või kannatust, või katse doosi vähendamine.”

11. Üksikasjalikke suuniseid ja arutelu kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute doosi valimise põhimõtete kohta on võimalik leida juhenddokumendist nr 116 (7) ning samuti kahest rahvusvahelise bioteaduste instituudi väljaandest (22, 23). Doosi valimise strateegia sõltub põhiliselt uuringu peamisest eesmärgist või peamistest eesmärkidest (punkt 6). Sobivate doositasemete valimisel tuleks saavutada tasakaal ühelt poolt ohu sõeluuringute ja teiselt poolt väikese doosi mõju iseloomustamise ning doosi ja mõju vahelise seose kindlakstegemise vahel. See on eriti oluline juhul, kui tehakse kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuring (käesoleva lisa peatükk B.33; punkt 12).

12. Tuleks kaaluda eraldi kroonilise mürgisuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.30) ja kantserogeensuse uuringu (käesolev katsemeetod B.32) tegemise asemel kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.33) tegemist. Kombineeritud katse võimaldab kokku hoida aega ja kulusid, võrreldes kahe eraldi uuringu tegemisega, kuid annab samasuguse kvaliteediga andmed nii kroonilise mürgisuse kui ka kantserogeensuse kohta. Kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.33) tegemisel tuleks siiski hoolikalt kaaluda doosi valimise põhimõtteid (punktid 11 ja 22–25) ning tuleb ka tunnistada, et mõnikord nõutakse eraldi uuringute tegemist eeskirjadega.

▼ **M4**

13. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud selle peatüki lõpus ja juhenddokumendis nr 116 (7).

KATSE PÕHIMÕTE

14. Uuritavat kemikaali manustatakse iga päev astmeliselt suurenevate doosidena mitmele katseloomade rühmale enamiku nende eluea kestel, tavaliselt suukaudselt. Sissehingamise teel või nahakaudne manustamine võib samuti olla sobiv. Katseloomi vaadeldakse hoolikalt mürgistusnähtude ja uudismoodustistest põhjustatud kahjustuste arengu jälgimiseks. Katse ajal surnud või tapetud loomad lahatakse ning katse lõpus tapetakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

MEETODI KIRJELDUS**Loomaliigi valimine**

15. Käesoleva katsemeetodiga hinnatakse peamiselt kantserogeensust näriliste jaoks (punkt 2). Muu loomaliigi kui näriliste kasutamist võib kaaluda siis, kui olemasolevad andmed osutavad, et selline liik sobib paremini inimesele avalduva tervisemõju prognoosimiseks. Liigi valikut tuleks põhjendada. Närilistest eelistatakse rotte, kuigi kasutada võib ka teisi närilisi, nt hiiri. Kuigi hiire kasutamine kantserogeensuse katsetel võib anda piiratud väärtusega tulemusi (24, 25, 26), nõutakse mõne praegu kehtiva regulatiivse kava alusel kantserogeensuse katsetamist hiirtel, kui ei ole kindlaks tehtud, et kõnealune uuring ei ole teaduslikult vajalik. Rotid ja hiired on olnud eelistatud katsemudelid tänu nende suhteliselt lühikesele elueale, laialdasele kasutamisele farmakoloogia- ja toksikoloogiauringutes, võimalusele kutsuda neil kergesti esile kasvajaid ja tänu piisavalt iseloomustatud liinide kättesaadavusele. Nende omaduste tulemusena on olemas palju teavet nende füsioloogia ja patoloogia kohta. Lisateave liigi ja aretusliini valimise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

16. Kasutatakse enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi. Kantserogeensuse uuring tuleks eelistatavalt teha samast liinist ja sama päritoluga loomadega, keda kasutati lühema kestusega mürgisuse eeluringu(te)s. Kui kõnealusest liinist ja kõnealuse päritoluga loomad võivad teadaolevalt põhjustada probleeme pikaajaliste uuringute üldtunnustatud ellujäämiskriteeriumide (vt juhenddokument nr 116 (7)) saavutamisel, tuleks kaaluda sellise loomaliini kasutamist, kelle ellujäämise määra on pikaajalise uuringu jaoks vastuvõetav. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined.

Pidamis- ja söötmingimused

17. Loomi võib hoida eraldi või väikestes samast soost loomade rühmades; eraldi pidamist tuleks kaaluda ainult juhul, kui see on teaduslikult põhjendatud (27, 28, 29). Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (±3 °C). Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärasest labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata. Sööt peaks vastama kõigile uuritava liigi toitumisvajadustele ja sööda saasteainesisaldus, sh pestitsiidijäägid, püsivad orgaanilised saasteained, fütoöstrogeenid, raskmetallid ja mükotoksiinid, mis võivad

▼ **M4**

mõjutada katse tulemusi, peaks olema võimalikult väike. Regulaarselt tuleks analüüsida sööda toitaineid ja saasteainete sisaldust; vähemalt tuleks seda teha uuringu alguses ja siis, kui hakatakse kasutama uut söödapartiid, ning analüüsides tulemused tuleks esitada lõpparuandes. Samuti tuleks esitada uuringus kasutatud joogivee analüüsi andmed. Sööda valikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali jaoks sobiv segu ja rahuldada loomade toitumisvajadused, kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga.

Loomade ettevalmistamine

18. Kasutada tuleks terveid loomi, kes on laboritingimustega vähemalt seitsme päeva jooksul kohanenud ning keda ei ole varem uuringutes kasutatud. Näriliste korral tuleks loomadele uuritava kemikaali annustamist alustada võimalikult varakult pärast võõrutamist ja kohanemist ning eelistatavalt enne, kui loomad on kaheksa nädala vanused. Katseloomi tuleks kirjeldada ja teatada liik, liin, päritolu, sugu, kehamass ja vanus. Uuringu alguses peaks kummagi soo loomade kehamassi erinevus olema minimaalne ja kõrvalekalle ei tohiks ületada 20 % uuringus kasutatavate loomade keskmisest kehamassist, mis leitakse eraldi kummagi soo loomade jaoks. Loomad tuleks kontroll- ja katserühmadesse jaotada juhuslikkuse alusel. Pärast juhuslikkuse alusel jaotamist ei tohiks rühmades kummagi soo keskmised kehamassid oluliselt erineda. Kui erinevused on statistiliselt olulised, tuleks juhuslikkuse alusel jaotamise etappi võimaluse korral korrata. Iga loomale tuleks määrata ainuline tunnusnumber ja loom tuleks kõnealuse numbriga püsivalt märgistada tätoveerimise, mikrokiibi paigaldamise või muu sobiva meetodi abil.

KATSE KÄIK**Loomade arv ja sugu**

19. Tuleks kasutada mõlemat sugu. Tuleks kasutada piisavat arvu loomi, et oleks võimalik põhjalik bioloogiline ja statistiline hindamine. Iga doosirühm ja samaaegne kontrollrühm peaks seega koosnema vähemalt 50 loomast kummagi soo kohta. Olenevalt uuringu eesmärgist võib suurendada peamiste näitajate statistilist tähtsust, kui jaotada loomad doosirühmadesse diferentseeritult (mitte võrdselt), nii et väikese doosi rühmades on rohkem kui 50 looma, näiteks väikeste dooside võimaliku kantserogeense mõju prognoosimiseks. Siiski tuleb tunnistada, et rühma mõningane suurendamine lisab uuringule suhteliselt vähe statistilist kaalu. Lisateave uuringu statistilise kavandamise ja doositasete valiku kohta statistilise olulisuse maksimeerimiseks on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

Loomade vahepealne surmamine ja satelliitühmad (kontrollühmad)

20. Kui see on teaduslikult põhjendatud, võib uuringus ette näha vahepealsed surmased, näiteks 12 kuu möödumisel, et saada teavet uudismoodustiste arengu ja toimemehhanismi kohta. Kui selline teave on uuritava kemikaaliga tehtud varasematest korduvdoosi mürgisuse uuringutest juba olemas, ei pruugi vahepealsed surmased olla teaduslikult põhjendatud. Kui uuringu kavas on vahepealseid surmamisi, on igas vahepealseks surmamiseks ette nähtud doosirühmas tavaliselt kümme looma kummagi soo kohta, ja uuringus kasutatavate loomade koguarvu tuleks suurendada nende loomade arvu võrra, keda on kavas surmata enne uuringu lõppu. Vajaduse korral võib uuringu vältel lisada haigusseisundi seireks täiendava kontroll-loomade rühma (tavaliselt viis looma kummastki soost) (30). Täpsemad juhendid on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

▼ **M4****Doosirühmad ja doseerimine**

21. Juhendid kõigi doosi valiku ja doositaseme intervallidega seotud asjaolude kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7). Tuleks kasutada vähemalt kolme doosimäära ja samaaegset kontrollrühma. Doositasemed põhinevad üldjuhul lühema ajavahemiku korduvdoosi või doosipiirkonna määramise katse tulemustel ja nende puhul tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali või samalaadsete kemikaalide kohta olemasolevat toksikoloogia- ja toksikokineetikaalast teavet.
22. Kui uuritava kemikaali füüsikalise-keemilised omadused või bioloogiline mõju seda ei piira, peaks kõrgeim doositase olema valitud nii, et saaks määrata kindlaks peamised sihtorganid ja toksilise toime, põhjustamata siiski kannatusi, ägedat mürgisust, haigestumist või surma. Punktis 23 allpool loetletud asjaolusid arvesse võttes tuleks tavaliselt valida kõrgeim doositase, et saada tõendusmaterjali mürgisuse kohta, näiteks kehakaalu tõusu vähenemise kaudu (ligikaudu 10 %). Sellest hoolimata võidakse uuringu eesmärkidest olenevalt (vt punkt 6) valida suurim doos, mis jääb allapoole mürgisust tõendavat doosi, näiteks kui doos avaldab teatavat kahjulikku mõju, kuid siiski ei mõjuta eluiga ega kehakaalu.
23. Doositaseme ja doositasemete intervalli võib valida nii, et määrata kindlaks mõju sõltuvus doosist, ning, olenevalt uuritava kemikaali toimeviisist, tähtsaks kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) või muu soovitud uuringutulemus, näiteks võrdlusdoos (BMD) (vt punkt 25) madalaimal doositasemel. Asjaolud, mida tuleks väiksemate dooside valimisel arvesse võtta, on toime doosist sõltuvuse eeldatav tõus, doosid, mis võivad põhjustada olulisi metaboliseerimise muutusi või toksilisuse toimemehhanismi muutumist, kui eeldatakse läviväärtuse olemasolu, või mille puhul eeldatakse väikeste dooside ekstrapoleerimise lähtepunkti olemasolu.
24. Doositasemete vahemik sõltub uuritava kemikaali omadustest ja seda ei saa käesoleva katsemeetodiga ette kirjutada, aga kahe- kuni neljakordne vahemik alanevate doositasemete määramisel annab sageli häid katsetulemusi ning dooside vahel väga suure (näiteks rohkem kui kuue- kuni kümnekordse) vahemiku kasutamise asemel on sageli parem lisada neljas katserühm. Üldiselt tuleks vältida kümnest suurema kordaja kasutamist ja kui seda tehakse, tuleks seda põhjendada.
25. Nagu juhenddokumendis nr 116 (7) on selgitatud, tuleb doosi valimisel arvesse võtta järgmist:
- doosi-toime sõltuvuse teadaolev või oletatav mittelineaarsus või murdepunkt;
 - toksikokineetika ja doosipiirkonnad, mille puhul esineb metaboolne induktatsioon, küllastumine või väliste ja sisemiste dooside vaheline mittelineaarsus või seda ei esine;
 - esmaskahjustused, toimemarkerid või märgid sellest, et tuleb arvesse võtta peamiste bioloogiliste alusprotsesside toimumist;
 - peamised (või oletatavad) toimeviisi asjaolud, näiteks annused, mille juures hakkab suurenema tsütotoksilisus, mõjutatakse hormoonitasemeid, homeostaasi säilitamise mehhanismid saavad üle koormatud jne;

▼ **M4**

— mõju doosist sõltuvuse kõvera piirkonnad, kus on vaja eriti usaldusväärset hinnangut, näiteks eeldatava võrdlusdoosi (BMD) vahemikus või oletatava läviväärtuse juures;

— inimeste kokkupuute eeldatava tasemega seotud kaalutlused.

26. Kontrollrühm on rühm, kellega katseid ei tehta, või kandeaine kontrollrühm, kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui katserühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui kasutatakse kandeainet, saab kontrollrühm kandeainet kõige suuremas koguses, mida kasutatakse doosirühmades. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga ja katseloomad söövad seda sööda halvema maitse tõttu oluliselt vähem, võib asjakohasema kontrollrühma tagamiseks olla sobiv täiendav kontrollrühm, kes saab samapalju sööta, kui doosirühmas ära süüakse.

Dooside ettevalmistamine ja uuritava kemikaali manustamine

27. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt suu kaudu koos sööda või joogiveega või sundsöötmisega. Lisateave manustamisteede ja -meetodite kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7). Manustamistee ja -meetod sõltub uuringu eesmärgist, uuritava kemikaali füüsikalistest/keemilistest omadustest, biosaadavusest ning inimese uuritava kemikaaliga kokkupuutumise peamisest teest ja viisist. Manustamistee ja -meetodi valikut tuleks põhjendada. Loomade heaolu arvestades tuleks suukaudne manustamine sundsöötmisega üldiselt valida ainult selliste ainetega, mille puhul kui see manustamistee ja -meetod on põhjendatult sarnane inimese võimaliku kokkupuutega kemikaaliga (näiteks ravimid). Toidu- või keskkonnakemikaalide puhul, sh pestitsiidide puhul toimub manustamine tavaliselt sööda või joogivee kaudu. Mõne stsenaariumi puhul, näiteks kokkupuute töökohal, võib olla asjakohasem manustada kemikaali muul viisil.
28. Vajaduse korral lahustatakse või suspenderitakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Vastavalt vajadusele tuleks arvesse võtta järgmisi kandeaine ja muude lisandite omadusi: mõju uuritava aine imendumisele, jaotumisele, metaboliseerimisele või retentsioonile; mõju uuritava kemikaali keemilistele omadustele, mis võivad muuta selle toksilisi omadusi, ning mõjud sööda või vee tarbimisele või loomade toitumisele. On soovitatav, et võimaluse korral kaalutakse esmalt vesilahuse/-suspensiooni kasutamist, seejärel õlilahuse/-emulsiooni (nt maisiõli) kasutamist ja siis võimalikku lahust muus kandeaines. Muu kandeaine kui vee puhul tuleks teada kandeaine mürgiseid omadusi. Tuleks teada uuritava kemikaali stabiilsust ning doseerimislahuste või sööda (nagu on asjakohane) homogeensust manustamise tingimustes (näiteks söödaga).
29. Nende kemikaalide puhul, mida manustatakse sööda või joogiveega, on oluline tagada, et sisseantavad uuritava kemikaali kogused ei muudaks tavalist toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Pikas mürgisuse uuringus, kus kemikaali manustatakse sööda kaudu, ei tohiks uuritava kemikaali kontsentratsioon söödas üldiselt olla suurem kui 5 % sööda üldkogusest, et vältida tasakaalustamata toitumist. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni söödas (mg sööda kg kohta või ppm) või püsivat doositaset looma kehamassi alusel (mg kehakaalu kg kohta), mis arvutatakse iga nädal. Tuleks täpsustada, millist võimalust kasutatakse.

▼ **M4**

30. Suukaudse manustamise korral manustatakse loomadele uuritavat kemikaali iga päev (seitse päeva nädalas), näriliste puhul üldjuhul 24 kuu vältel (vt ka punkt 32). Iga muu doseerimismeetodi (nt viis päeva nädalas) kasutamist tuleb põhjendada. Nahakaudse manustamise puhul töödeldakse loomi üldjuhul uuritava kemikaaliga 24 kuu vältel vähemalt kuus tundi päevas seitse päeva nädalas, nagu on sätestatud käesoleva lisa peatükis B.9 (11). Sissehingamise teel toimuv kokkupuude toimub kuus tundi päevas ja seitse päeva nädalas; võib kasutada ka kokkupuudet viiel päeval nädalas, kui see on põhjendatud. Kokkupuuteperiood on tavaliselt 24 kuud. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu näriliseligi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Kui päevas kasutatakse alla kuuetunnist kokkupuute kestust, tuleks seda põhjendada. Vt ka käesoleva lisa peatükk B.8 (9).
31. Kui loomadele manustatakse uuritavat kemikaali sundsöötmisega, tuleks seda teha iga päev umbes samal kellaajal maosondi või sobiva intubatsiooni-kanüüli abil. Tavaliselt manustatakse üks annus üks kord päevas, kui aga kemikaal on näiteks lokaalne ärritaja, võib igapäevase doosimäära säilitada, manustades jaotatud annust (kaks korda päevas). Suurim vedelikukogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus peaks olema nii väike kui praktiliselt võimalik ega tohiks üldjuhul näriliste puhul ületada 1 ml kehakaalu 100 g kohta (31). Katses kasutatava mahu erinevusi tuleks vähendada miinimumini; püsiva mahu tagamiseks tuleks kõikidel doositasemetel kasutada erinevaid kontsentratsioone. Erandiks on võimaliku söövitava või ärritava mõjuga kemikaalid, mida tuleb tugeva paikse mõju vältimiseks lahjendada. Tuleks vältida katseid kontsentratsioonidel, mis tõenäoliselt võivad seedetrakti söövitada või ärritada.

Uuringu kestus

32. Uuringu kestus on näriliste puhul tavaliselt 24 kuud, mis moodustab suurema osa kasutatavate loomade tavalisest elueast. Võib kasutada lühemat või pikemat uuringu kestust, olenevalt uuringus kasutatava loomaliigi liini elueast, aga seda tuleks põhjendada. Konkreetsete hiireliinide puhul, näiteks liin AKR/J, C3H/J või C57BL/6J, võib asjakohasem olla 18kuuline kestus. Allpool on esitatud suunised uuringu kestuse ja lõpetamise ning ellujäämuse kohta; täpsemad suunised, sh uuringus ellujäämusega võrreldes negatiivse kantserogeensuse lubatavuse kaalumise, on esitatud OECD juhenddokumendis nr 116, mis käsitleb kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute koostamist ja elluviimist (7).

— Kui väiksema doosi rühmade või kontrollrühma ellujäänute arv langeb alla 25 %, tuleks kaaluda uuringu lõpetamist.

— Kui mürgistuse tõttu sureb enneaegselt ainult suure doosi rühm, ei tohiks selle pärast uuringut lõpetada.

— Kummagi soo ellujäämist tuleks arvesse võtta eraldi.

— Uuringut ei tohiks pikendada selle ajavahemikuni, kus uuringust saadavad andmed ei ole enam piisavad statistiliselt kehtivate hinnangute andmiseks.

▼ **M4**

VAATLUSED

33. Kõiki loomi tuleks haigestumise või suremise suhtes kontrollida, tavaliselt iga päeva alguses ja lõpus, sh nädalavahetustel ja pühadel. Loomi tuleks täiendavalt kontrollida kord päevas konkreetsete mürgistusnähtude suhtes, võttes sundsöötmisega manustamise puhul arvesse eeldatava mõju kõrgperioodi pärast doseerimist. Erilist tähelepanu tuleks pöörata kasvajate tekkimisele; iga nähtava või palpeeritava tuumori kohta tuleb märkida ilmumise aeg, paiknemine, mõõtmed, välimus ja areng.

Kehamass, sööda ja vee tarbimine ning söödakasutuse tõhusus

34. Kõiki loomi tuleks kaaluda kemikaali manustamise alguses, vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Sööda tarbimist ja söödakasutuse tõhusust tuleks mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ning seejärel vähemalt kord kuus. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, siis tuleks vee tarbimist mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Joogivee tarbimise mõõtmisi tuleks kaaluda ka uuringute puhul, milles muutub loomade joomiskäitumine.

Hematoloogilised, kliinilise biokeemia ja muud mõõtmised

35. Uuringust saadava teabe, eelkõige toimeviisiga seotud teabe maksimeerimiseks tuleks uuringu juhi äranägemise järgi võtta hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia analüüside jaoks vereproove. Samuti võib olla asjakohane uriinianalüüsi tegemine. Täpsemad juhendid kantserogeensuse uuringu raames kõnealuste proovide võtmise väärtuse kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7). Kui peetakse vajalikuks, võib hematoloogiliste ja kliinilise keemia näitajate kindlaksmääramiseks võtta vereproovid ja teha uriinianalüüs vahepealse surmamise osana (punkt 20) ning uuringu lõpus vähemalt kümne loomaga kummagi soo ja iga rühma kohta. Vereproovid tuleks võtta kindlaksmääratud kohast, näiteks otse südamest või retroorbitaalsest siinusest, kasutades tuimestust, ning kui proov on võetud, tuleks seda hoida vajalikes tingimustes. Uurimiseks võib samuti valmistada vere äigepreparaadid, eelkõige juhul, kui luuüdi näib olevat sihtorgan, kuigi kõnealuse uuringu väärtus kantserogeense/onkogeense mõju hindamiseks on küsitav (32).

PATOLOOGIA

Täielik lahkamine

36. Kõik uuringus kasutatud loomad, v.a kontrollloomad (vt punkt 20) ja muud satelliitrühma loomad, läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki avasid, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisaldist. Kontrollloomade ja muude satelliitrühma loomade puhul võib uuringu juht konkreetsel juhul otsustada, kas lahkamine on vajalik. Organite massi kantserogeensuse uuringutes tavaliselt ei määrata, kuna geriaatrilised muutused ja hilisematel etappidel kasvajate areng piirab organite massi andmete kasulikkust. Kõnealused andmed võivad siiski olla üliolulised tõendusmaterjali kaalukuse hindamisel ja eelkõige toimeviisi hindamisel. Kui satelliituuringus seda määratakse, tuleks kõnealused andmed koguda hiljemalt aasta möödumisel uuringu algusest.

▼M4

37. Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu (vt punkt 33) seisukohast kõige sobivamas fikseerimiskeskonnas (kandilistes sulgudes esitatud organite uuring ei ole kohustuslik):

Kõik silmaga nähtavad kahjustused	Süda	Kõhunääre	Magu (eesmagu, mao näärmine osa)
Neerupealis	Niudesool	Kõrvalkilpnääre	[Hambad]
Aort	Tühisool	Perifeerne närv	Munandid
Aju (sh suuraju osad, väikeaju ning piklikaju/sild)	Neerud	Ajuripats	Harknääre
Umbsool	Pisaranääre (eksoorbi-taalne)	Eesnääre	Kilpnääre
Emakakael	Maks	Pärasool	[Keel]
Koagulatsiooninääre	Kops	Süljenääre	Hingetoru
Käärsool	Lümfisõlmed (nii pealispinnalt kui ka sügavalt)	Seemnepõiekessed	Kusepõis
Kaksteistsõrmiksool	Piimanääre (kohustuslik emaste puhul ja kui see on nähtavalt lõigatav, siis isaste puhul)	Skeletilihas	Emakas (sh emakakael)
Munandimanus	[Ülemised hingamisteed, sh nina, ninakarbid ja nina kõrvalkoopad]	Nahk	[Kusejuha]
Silm (sh võrkkest)	Söögitoru	Seljaaju (kolmel tasandil: kaela-, rinna- ja nimmepiirkond)	[Kusiti]
[Reieluu koos liigesega]	[Haistmissibul]	Põrn	Tupp
Sapipõis (muud liigid kui rott)	Munasarjad	[Rinnak]	Luuüdi lõige ja/või värske luuüdi aspiraati
Harderi nääre			

Paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks säilitada mõlemad organid. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Säilitada tuleks ka muud organid, mis uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt võivad tõenäoliselt olla sihtorganid. Nahakaudse manustamise uuringute puhul tuleks säilitada need organid, mis on ette nähtud suukaudse manustamise puhul, ning ülioluline on manustamiskohast nahaproovide võtmine ja säilitamine. Inhalatsiooniuringute korral tuleks hingamisteedest säilitatavate ja uuritavate kudede puhul järgida käesoleva lisa peatükkide B.8 ja B.29 soovitusi. Muude organite/kudede puhul (ja lisaks hingamisteedest pärit konkreetselt säilitatavatele kudede) tuleks järgida suukaudse manustamise puhul esitatud organite nimekirja.

▼M4*Histopatoloogia*

38. On avaldatud juhendid toksikoloogilise patoloogia uuringute tegemise parimate tavade kohta (33). Tuleb teha vähemalt järgmised histopatoloogilised uuringud:
- suure annuse ja kontrollrühma loomade kõik koed;
 - uuringu vältel surnud või surmatud loomade kõik koed;
 - kõik koed, milles täheldatakse makroskoopilisi anomaaliaid, kaasa arvatud kasvajad;
 - kui suure doosi rühmas täheldatakse uuritava kemikaaliga kokkupuutest tingitud histopatoloogilisi muutusi, kontrollitakse kõikide muude doosirühmade loomadel samu kudesid;
 - paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks uurida mõlemat organit.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmed**

39. Kõigi hinnatavate parameetrite kohta tuleks esitada iga looma andmed. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, katse ajal surnud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arv, mürgistusnähtudega loomade arv, täheldatud mürgistusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgise toime ilmumine, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik ja iga liiki kahjustuse kohta nende loomade protsent, kellel seda esines. Kokkuvõtlikes tabelites tuleks esitada (pidevalt mõõdetud katseandmete puhul) nende loomade keskmised ja standardhälbed, kellel täheldati mürgisuse mõju või kahjustusi, lisaks kahjustuse raskusastme määramisele.
40. Varasemad kontrolli andmed võivad aidata uuringu tulemusi tõlgendada, näiteks kui samaaegse kontrolli andmed erinevad oluliselt sama katsekorralduse juures kontrollrühma loomadelt saadud hiljutistest andmetest. Hindamiseks võetud varasemad kontrolli andmed peaksid pärinema samast laborist, olema saadud sama vanuserühma ja sama liini loomadega ning olema kogutud kõnealusele uuringule eelneva viie aasta jooksul.
41. Võimaluse korral tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohase ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Statistilised meetodid ja analüüsivad andmed tuleks valida uuringu kavandamise etapis (punkt 9). Sellisel valimisel tuleks vajaduse korral ette näha, et tulemusi tuleb kohandada ellujäämise määra arvestamiseks.

Katseprotokoll

42. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

- füüsikaline olemus, puhtus ja füüsikalised-keemilised omadused;
- tunnusandmed;

▼ M4

- kemikaali päritolu;
- partii number;
- keemilise analüüsi sertifikaat.

Kandeaine (vajaduse korral):

- kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

Katseloomad:

- kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;
- loomade arv, vanus ja sugu katse alguses;
- päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;
- iga looma kehamass katse alguses.

Katsetingimused:

- manustamistee ja annuse valiku põhjendus;
- kui see on kohaldatav, siis andmete analüüsimiseks valitud statistilised meetodid;
- andmed uuritava kemikaali preparaadi/sööda valmistamise kohta;
- analüüsiandmed preparaadis saavutatud kontsentratsiooni, preparaadi stabiilsuse ja homogeensuse kohta;
- manustamistee ja uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- inhalatsiooniuuringu puhul: kas manustamine toimub ainult nina või kogu keha kaudu;
- tegelik doos (mg kehakaalu kg kohta päevas) ja vajaduse korral ümberarvestustegur söödas või joogivees oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (mg/kg või ppm) ja tegeliku doosi vahel;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad.

*Tulemused (tuleks esitada kokkuvõtlikud tabelandmed ja andmed eraldi iga looma kohta)**Üldosa:*

- ellujäämuse andmed;
- kehamass / kehamassi muutused;
- sööda tarbimine, söödakasutuse tõhususe arvutused (kui need tehti) ja vee tarbimine, kui see on kohaldatav;
- võimaluse korral toksiko-kineetilised andmed;
- oftalmoskoopia võimaluse korral;
- hematoloogia andmed võimaluse korral;
- kliinilise keemia andmed võimaluse korral.

▼M4*Kliinilised leiud:*

- toksilisuse tunnused;
- iga anomaalia esinemissagedus (ja kui määrati, siis raskusaste);
- kliiniliste ilmingute laad, raskus ja kestus (sõltuvalt sellest, kas ilmingud on ajutised või püsivad).

Lahkamise andmed:

- kehamass surmamisel;
- organite mass (ja kui võimalik, siis organi massi / kehamassi suhe);
- lahkamise leiud; anomaaliade esinemissagedus ja raskusaste.

Histopatoloogia:

- uudismoodustistega mitteseotud histopatoloogilised leiud;
- uudismoodustistega seotud histopatoloogilised leiud;
- korrelatsioon makroskoopiliste ja mikroskoopiliste tulemuste vahel;
- kõigi kemikaaliga kokkupuutest tingitud histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus koos raskusastme hindamisega;
- aruanne mikrokoobipreparaatide võimalike vastastikuste hindamise kohta.

*Vajaduse korral tulemuste statistiline töötlus.**Tulemuste arutelu:*

- võimalike modelleerimis põhiste lähenemisviiside arutelu;
- toime sõltuvus doosist;
- varasemad kontrolli andmed;
- võimalikku toimeviisi käsitleva teabe analüüsimine;
- võrdlusdoosi (BMD), täheldatava kahjuliku toimeteta doosi (NOAEL) või vähima täheldatava kahjuliku toimega doosi (LOAEL) kindlaksmääramine;
- asjakohasus inimeste puhul.

*Järeldused**KIRJANDUS*

- 1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- 2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- 3) Combes RD, Gaunt, I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.
- 4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.
- 5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.

▼M4

- 6) Käesoleva lisa peatükk B.27 „Subkroonilise suukaudse toksilisuse katse – suukaudse kordusdoosi toksilisuse 90-päevane uuring mittenärilistel”.
- 7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 - Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.
- 8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- 9) Käesoleva lisa peatükk B.8 „Subakuutne mürgisus sissehingamisel: 28-päevane uuring”.
- 10) Käesoleva lisa peatükk B.29 „Subkrooniline mürgisus sissehingamisel: 90-päevane uuring”.
- 11) Käesoleva lisa peatükk B.9 „Kordusdoosi mürgisus (28 päeva, naha-kaudne)”.
- 12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. *Crit. Rev. in Toxicol*, 36:793–801.
- 13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, and Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. *Crit. Rev. Toxicol*. 33:581–589.
- 14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci*. 89:51–56.
- 15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol*. 33:591–653.
- 16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR et al (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 1–7.
- 17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T et al (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9–35.
- 18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A et al (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 37–68.
- 19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM et al (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Critical Reviews in Toxicology* 36: 69–98.
- 20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- 21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.

▼ **M4**

- 22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West, W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol.* 37 (9): 729–837.
- 23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- 24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- 25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279–284.
- 26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect.* 105:1196–1203.
- 27) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 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, *et al.* (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, *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126–131.

▼ **M4**

1. liide

MÕISTE

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M4****B.33. KOMBINEERITUD KROONILISE TOKSILISUSE – KANTSEROGEENSUSE UURING**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 453 (2009). Esialgne katsejuhend TG 453 võeti vastu 1981. aastal. Käesoleva ajakohastatud katsemeetodi B.33 koostamist peeti vajalikuks, et võtta arvesse hiljutist arengut loomade heaolu ja regulatiivsete nõuete valdkonnas (1, 2, 3, 4, 5). Käesolevat katsemeetodit B.33 on ajakohastatud paralleelselt käesoleva lisa peatüki B.32 („Kantserogeensuse uuringud”) ja peatüki B.30 („Kroonilise mürgisuse uuringud”) läbivaatamisega selleks, et saada uuringus kasutatavate loomade abil lisateavet ning esitada täpsemaid andmeid dooside valiku kohta. Käesolev katsemeetod on koostatud selleks, et kasutada seda mitmesuguste kemikaalide, sh pestitsiidide ja tööstuslike kemikaalide katsetamiseks. Siiski tuleks märkida, et mõned üksikasjad ja nõuded võivad ravimite puhul olla erinevad (vt rahvusvahelise ühtlustamis-konverentsi suunis S1B, mis käsitleb ravimite kantserogeensuse katsetamist).

2. Enamik kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringuid tehakse näriliselike ja käesolev katsemeetod on seega kavandatud peamiselt kasutamiseks nende liikidega tehtavate uuringute puhul. Kui selliseid uuringuid on vaja teha mittenärilistega, võib samuti rakendada käesolevas katsemeetodis kirjeldatud põhimõtteid ja toimimiskäiku koos põhimõtete ja toimimiskäiguga, mida on kirjeldatud käesoleva lisa peatükis B.27 („Korduvdoosi suukaudse mürgisuse 90-päevane uuring mittenäriliste puhul”) (6) koos asjakohaste muudatustega, nagu on sätestatud OECD juhenddokumendis nr 116, mis käsitleb kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute kavandamist ja tegemist (7).

3. Kroonilise mürgisuse – kantserogeensuse uuringutes kasutatavad kolm peamist manustamisteed on suukaudne, nahakaudne ja sissehingamise teel manustamine. Manustamisviisi valik sõltub uuritava kemikaali füüsikalistest ja keemilistest omadustest ning inimeste peamisest võimalikust ainega kokkupuutumise viisist. Lisateave kokkupuutete valimise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

4. Käesolevas katsemeetodis on keskendutud suukaudsele manustamisele, mis on kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringutes enim kasutatav manustamistee. Kuigi inimeste tervist ohustavate riskide hindamiseks võivad vajalikud olla ka pikaajalised uuringud, mis hõlmavad nahakaudset või sissehingamise teel toimuvat kokkupuudet, ja/või neid võidakse nõuda teatavate eeskirjadega, on mõlema nimetatud kokkupuutete puhul katsete korraldamine tehniliselt keeruline. Kõnealused uuringud tuleb kavandada juhtumipõhiselt, kuigi siin suukaudse manustamise kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse hindamiseks kirjeldatud katsemeetodi võib võtta aluseks sissehingamise teel ja/või nahakaudse manustamise uuringu katse-eeskirja koostamisel ja arvestades manustamise ajavahemikke, kliinilisi ja patoloogilisi parameetreid jne käsitlevaid soovitusi. On olemas OECD juhenddokumendid uuritava kemikaali sissehingamise teel (7, 8) ja nahakaudselt (7) manustamise kohta. Kui kavandatakse sissehingamise kaudu toimuvat kokkupuudet hõlmavaid pikaajalisi uuringuid, tuleks eelkõige vaadata käesoleva lisa peatükke B.8 (9) ja B.29 (10) koos sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse uurimist käsitleva OECD juhenddokumendiga (8). Nahakaudse manustamise katsete tegemisel tuleks vaadata käesoleva lisa peatükki B.9 (11).

▼M4

5. Kombineeritud kroonilise mürgisuse – kantserogeensuse uuring annab teavet võimalike terviseriskide kohta, mis võivad tõenäoliselt tekkida korduva kokkupuute korral kasutatava liigi kogu eluea jooksul. Uuringuga saadakse teavet uuritava kemikaali mürgiste mõjude, sealhulgas võimaliku kantserogeensuse kohta, võidakse teha kindlaks sihtorganid ja kemikaali akumulatsiooni võimalikkus. Sellega võidakse hinnata täheldatava kahjuliku toimeteta doosi taset toksilise mõju puhul ning mittegenotoksiliste kantserogeenide puhul kasvajate teket; saadud andmeid saab kasutada inimeste kokkupuute jaoks ohutuskriteeriumide kehtestamiseks. Samuti rõhutatakse vajadust teha loomade hoolikas kliiniline läbivaatus, et hankida võimalikult palju teavet.

6. Käesoleva katsemeetodi kohaste kroonilise mürgisuse – kantserogeensuse uuringute eesmärgid on järgmised:
 - uuritava kemikaali selliste kantserogeensete omaduste kindlakstegemine, mis põhjustavad uudismoodustiste arvu suurenemist, pahaloomuliste uudismoodustiste osakaalu suurenemist või uudismoodustiste tekkeni kuluva aja lühenemist, võrreldes samal ajal kasutatavate kontrollrühmadega;
 - uudismoodustiste tekkimiseni kuluva aja kindlakstegemine;
 - uuritava kemikaali kroonilise mürgisuse kindlaksmääramine;
 - kroonilise mürgisuse ja kantserogeense toime sihtorgani(te) tuvastamine;
 - mõju doosist sõltuvuse kirjeldamine;
 - täheldatava kahjuliku toimeteta doositaseme (*no-observed-adverse-effect level*, NOAEL) või võrdlusdoosi (*Benchmark Dose*, BMD) kindlakstegemiseks lähtepunkti määramine;
 - kantserogeense toime ekstrapoleerimine inimeste madala doositasemega kokkupuutele;
 - kroonilise mürgise mõju prognoosimine inimeste kokkupuutetasemetel;
 - andmete saamine toimeviisi käsitlevate hüpoteeside kontrollimiseks (2, 7, 12, 13, 14, 15).

LÄHTEKAALUTLUSED

7. Uuritava kemikaali võimalike kantserogeensete ja kroonilise mürgisuse omaduste hindamisel peaks uurimislabor enne uuringu tegemist võtma arvesse kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, et uuringu kavandamisel keskenduda toksikoloogilise toime võimaluse kõige tõhusamale katsetamisele ja minimeerida loomade kasutamine. Teave eeldatava kantserogeeni toimeviisi kohta ja selle arvessevõtmine (2, 7, 12, 13, 14, 15) on eriti tähtis, kuna katse optimaalseks kavandamiseks võib olla vaja teada, kas uuritav kemikaal on teadaolev või eeldatav genotoksiline kantserogeen. Täpsemad juhendid toimeviisi arvestamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

8. Uuringu kavandamist hõlbustav teave hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalised-keemilised omadused; teave võimaliku toimeviisi kohta; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse, sealhulgas genotoksilise katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed, mutageensus/genotoksilisus, kantserogeensus ja muud toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuriga ainete kohta; olemasolevad toksiko-kineetilised andmed (võimaluse korral ühekordse doosi ja korduvdoosi kineetika) ning muud korduva

▼ M4

kokkupuute uuringutega saadud andmed. Kroonilist mürgisust ja kantserogeensust tuleks uurida alles pärast esialgse mürgisust käsitleva teabe saamist korduvdoosi 28-päevasest ja/või 90-päevasest mürgisuse katsest. Kasulikku teavet võivad anda ka lühiajalised vähi tekke ja arenemise katsed. Konkreetse uuritava kemikaali võimalike kahjulike tervisemõjude üldhindamisel tuleks kaaluda kantserogeensuse järkjärgulise uurimise lähenemisviisi (16, 17, 18, 19).

9. Enne uuringu alustamist tuleks uuringu kava ja eesmärkide alusel kindlaks määrata kõige sobivamad tulemuste analüüsi statistilised meetodid. Kaaluda tuleb seda, kas statistika peaks hõlmama ellujäämise arvessevõtmist, katse ellujäämise kestusega seotud kasvajatekke kumulatiivse riski analüüsi, kasvaja tekkimiseni kuluva aja analüüsi ning analüüsi tegemist ühe või mitme rühma kavandatud varasema surmamise korral. Suunised asjakohaste statistiliste analüüside tegemiseks ja peamised viited rahvusvaheliselt tunnustatud statistilistele meetoditele on esitatud juhenddokumentides nr 116 (7) ning nr 35, milles käsitletakse kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute analüüsi ja hindamist (20).

10. Kantserogeensuse uuringu tegemisel tuleks alati järgida suunispõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on sätestatud OECD juhenddokumendis nr 19 kliiniliste nähtude tuvastamise, hindamise ja kasutamise kohta ohutuse hindamisel kasutatavate katseloomade humaansete lõpetamiskriteeriumidena (21) ja eelkõige selle punktis 62. Kõnealuses punktis on sätestatud, et „[k]ui uuringutes, milles kasutatakse korduvat annustamist, tekivad loomal kliinilised progresseeruvad nähud, mis põhjustavad tema seisundi halvenemise, tuleb teha andmetel põhinev otsus, kas loom tuleks humaansel viisil surmata. Otsuse tegemisel tuleks kaaluda kõnealuse uuringus osaleva looma jätkuvast elushoidmisest saadava teabe väärtust võrreldes looma üldise seisundiga. Kui tehakse otsus kõnealune loom katsesse jätta, tuleks vajaduse korral suurendada vaatluste sagedust. Ilma katse eesmärki kahjulikult mõjutamata võib samuti olla võimalik annustamise ajutine peatamine, kui see vähendab looma valu või kannatusi, või katsedoosi vähendamine.”

11. Üksikasjalikke suuniseid ja arutelu kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringute doosi valimise põhimõtete kohta on võimalik leida juhenddokumendist nr 116 (7) ning samuti kahest rahvusvahelise bioteaduste instituudi väljaandest (22, 23). Doosi valimise strateegia sõltub põhiliselt uuringu peamisest eesmärgist või peamistest eesmärkidest (punkt 6). Sobivate doositasemete valimisel tuleks saavutada tasakaal ühelt poolt ohu söeluuringute ja teiselt poolt väikese doosi mõju iseloomustamise ning doosi ja mõju vahelise seose kindlakstegemise vahel. See on eriti asjakohane käesoleva kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu puhul.

12. Tuleks kaaluda eraldi kroonilise mürgisuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.30) ja kantserogeensuse uuringu (käesoleva lisa peatükk B.32) tegemise asemel käesoleva kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu tegemist. Kombineeritud katse võimaldab kokku hoida aega ja kulusid ning mõnevõrra vähendada ka katseloomade kasutamist, võrreldes kahe eraldi uuringu tegemisega, kuid annab samasuguse kvaliteediga andmed nii kroonilise mürgisuse kui ka kantserogeensuse kohta. Kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu tegemisel tuleks siiski hoolikalt kaaluda doosi valimise põhimõtteid (punktid 11 ja 22–26) ning tuleb ka tunnistada, et mõnikord nõutakse eraldi uuringute tegemist eeskirjadega. Täpsemad juhendid kombineeritud kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse uuringu kavandamise kohta, et kasutada võimalikult vähe katseloomi ning teha uuring võimalikult lihtsalt ja tõhusalt, on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

▼M4

13. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud selle peatüki lõpus ja juhenddokumendis nr 116 (7).

KATSE PÕHIMÕTE

14. Uuringu kava koosneb kahest paralleelsest etapist: kroonilisuse etapp ja kantserogeensuse etapp (kestused on esitatud vastavalt punktides 34 ja 35). Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt suu kaudu, kuigi ka sissehingamise või nahakaudse kokkupuute uurimine võib olla sobiv. Kroonilisuse etapi puhul manustatakse uuritavat kemikaali iga päev astmeliste doosidena mitmele katseloomade rühmale, igale katseloomade rühmale ühel doosistmel, tavaliselt 12 kuu vältel, kuigi regulatiivsetest nõuetest olenevalt võib katse kestus olla ka pikem või lühem (vt punkt 34). Katse selline kestus tagab, et see on piisavalt pikk kumulatiivse mürgisuse mõjude avaldamiseks, kuid tulemusi ei hakka veel segama geriaatrilised muutused. Uuringu kavaga võib ette näha ühe või mitu vahepealset surmamist, näiteks kolme ja kuue kuu möödudes, ja selle võimaldamiseks võib kasutada täiendavaid loomarühmi (vt punkt 20). Kantserogeensuse etapi puhul manustatakse uuritavat kemikaali iga päev mitmele katseloomade rühmale nende elueast suure osa vältel. Mõlemal etapil vaadeldakse katseloomi hoolikalt mürgistusnähtude ja uudismoodustistest põhjustatud kahjustuste arengu jälgimiseks. Katse ajal surnud või tapetud loomad lahatakse ning katse lõpus tapetakse ja lahatakse ka ellujäänud loomad.

MEETODI KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

15. Käesoleva katsemeetodiga hinnatakse peamiselt kroonilist mürgisust ja kantserogeensust näriliste jaoks (punkt 2). Muu loomaliigi kui näriliste kasutamist võib kaaluda siis, kui olemasolevad andmed osutavad, et selline liik sobib paremini inimesele avalduva tervisemõju prognoosimiseks. Liigi valikut tuleks põhjendada. Närilistest eelistatakse rotte, kuigi kasutada võib ka teisi närilisi, nt hiiri. Kuigi hiire kasutamine kantserogeensuse katsetel võib anda piiratud väärtusega tulemusi (24, 25, 26), nõutakse mõne praegu kehtiva regulatiivse kava alusel kantserogeensuse katsetamist hiirtel, kui ei ole kindlaks tehtud, et kõnealune uuring ei ole teaduslikult vajalik. Rotid ja hiired on olnud eelistatud katsemudelid tänu nende suhteliselt lühikesele elueale, laialdasele kasutamisele farmakoloogia- ja toksikoloogiauringutes, võimalusele kutsuda neil kergesti esile kasvaja ja tänu piisavalt iseloomustatud liinide kättesaadavusele. Nende omaduste tulemusena on olemas palju teavet nende füsioloogia ja patoloogia kohta. Kui nõutakse kroonilise mürgisuse – kantserogeensuse uuringut muu liigiga kui närilised, peaks selle kavandamine ja tegemine toetuma põhimõtetele, mis on esitatud käesolevas katsemeetodis ja käesoleva lisa peatükis B.27 („Korduvdoosi suukaudse mürgisuse 90-päevane uuring mittenäriliste puhul”) (6). Lisateave liigi ja aretusliini valimise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

16. Kasutatakse enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud loomi. Kroonilise mürgisuse ja kantserogeensuse kombineeritud uuring tuleks eelistatavalt teha samast liinist ja sama päritoluga loomadega, keda kasutati lühema kestusega mürgisuse eeluringu(te)s. Kui kõnealusest liinist ja kõnealuse päritoluga loomad võivad teadaolevalt põhjustada probleeme pikaajaliste uuringute üldtunnustatud ellujäämiskriteeriumide (vt juhenddokument nr 116 (7)) saavutamisel, tuleks kaaluda sellise loomaliini kasutamist, kelle ellujäämise määr on pikaajalise uuringu jaoks vastuvõetav. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined.

▼ **M4****Pidamis- ja söötistingimused**

17. Loomi võib hoida eraldi või väikestes samast soost loomade rühmades; eraldi pidamist tuleks kaaluda ainult juhul, kui see on teaduslikult põhjendatud (27, 28, 29). Puurid paigutatakse nii, et puuri asukohast tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (±3 °C). Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötisel võib kasutada tavapärasest labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata. Sööt peaks vastama kõigile uuritava liigi toitumisvajadustele ja sööda saasteainesisaldus, sh pestitsiidijäägid, püsivad orgaanilised saasteained, fütöstrogeenid, raskmetallid ja mükotoksiinid, mis võivad mõjutada katse tulemusi, peaks olema võimalikult väike. Regulaarselt tuleks analüüsida sööda toitainete ja saasteainete sisaldust; vähemalt tuleks seda teha uuringu alguses ja siis, kui hakatakse kasutama uut söödapartiid, ning analüüsida tulemused tuleks esitada lõpparuandes. Samuti tuleks esitada uuringus kasutatud joogivee analüüsi andmed. Sööda valikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali jaoks sobiv segu ja rahuldada loomade toitumisvajadused, kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga.

Loomade ettevalmistamine

18. Kasutada tuleks terveid loomi, kes on laboritingimustega vähemalt seitsme päeva jooksul kohanenud ning keda ei ole varem uuringutes kasutatud. Näriliste korral tuleks loomadele uuritava kemikaali annustamist alustada võimalikult varakult pärast võõrutamist ja kohanemist ning eelistatavalt enne, kui loomad on kaheksa nädala vanused. Katseloomi tuleks kirjeldada ja teatada liik, liin, päritolu, sugu, kehamass ja vanus. Uuringu alguses peaks kummagi soo loomade kehamassi erinevus olema minimaalne ja kõrvalekalle ei tohiks ületada 20 % uuringus kasutatavate loomade keskmisest kehamassist, mis leitakse eraldi kummagi soo loomade jaoks. Loomad tuleks kontroll- ja katserühmadesse jaotada juhuslikkuse alusel. Pärast juhuslikkuse alusel jaotamist ei tohiks rühmades kummagi soo keskmised kehamassid oluliselt erineda. Kui erinevused on statistiliselt olulised, tuleks juhuslikkuse alusel jaotamise etappi võimaluse korral korrata. Iga loomale tuleks määrata ainuline tunnusnumber ja loom tuleks kõnealuse numbriga püsivalt märgistada tätoverimise, mikrokiibi paigaldamise või muu sobiva meetodi abil.

KATSE KÄIK**Loomade arv ja sugu**

19. Tuleks kasutada mõlemat sugu. Tuleks kasutada piisavat arvu loomi, et oleks võimalik põhjalik bioloogiline ja statistiline hindamine. Näriliste puhul peaks kantserogeensuse etapil igas doosirühmas (nagu on näidatud punktis 22) ja samaaegses kontrollrühmas seega olema vähemalt 50 looma kummastki soost. Olenevalt uuringu eesmärgist võib suurendada peamiste näitajate statistilist tähtsust, kui jaotada loomad doosirühmadesse diferentseeritult (mitte võrdset), nii et väikese doosi rühmades on rohkem kui 50 looma, näiteks väikeste dooside võimaliku kantserogeense mõju prognoosimiseks. Siiski tuleb tunnistada, et rühma mõningane suurendamine lisab uuringule suhteliselt vähe statistilist kaalu. Kroonilise mürgisuse etapil peaks igas doosirühmas (nagu on näidatud punktis 22) ja samaaegses kontrollrühmas seega olema vähemalt kümme looma kummastki soost, kui

▼M4

kasutatakse närlisi. Tuleb märkida, et see arv on väiksem kui kroonilise mürgisuse uuringu puhul (käesoleva lisa peatükk B.30). Väiksema loomade arvuga rühma andmete tõlgendamine kõnealuse kombineeritud uuringu kroonilise mürgisuse etapis toetub aga uuringu kantserogeensuse etapi suurema arvu loomade põhjal saadud andmetele. Hiirtega tehtavates uuringutes võib olla vajalik kasutada kroonilise mürgisuse etapis igas doositaseme rühmas rohkem loomi, et teha kõik nõutavad hematoloogilised analüüsid. Lisateave uuringu statistilise kavandamise ja doositasemete valiku kohta statistilise olulisuse maksimeerimiseks on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

Loomade vahepealne surmamine, satelliitrühm ja kontroll-loomad

20. Kui see on teaduslikult põhjendatud, võib uuringus ette näha vahepealseid surmamised, näiteks kroonilise mürgisuse etapis kuue kuu möödumisel, et saada teavet muude kui uudismoodustistega seotud muutuste arengu ja toimemehhanismi kohta. Kui selline teave on uuritava kemikaaliga tehtud varasematest korduvdoosi mürgisuse uuringutest juba olemas, ei pruugi vahepealsed surmamised olla teaduslikult põhjendatud. Uuringu tavaliselt 12 kuud kestva (punkt 34) kroonilise mürgisuse etapis kasutatavatest loomadest saadakse vahepealse surmamise andmed uuringu kantserogeensuse etapi jaoks, millega vähendatakse kasutatavate loomade üldarvu. Uuringu kroonilise mürgisuse etapis võidakse samuti kasutada satelliitrühmi, et jälgida uuritava kemikaali põhjustatud mis tahes toksikoloogiliste muutuste pöördumist. Nende puhul võidakse piirduda uuringu suurima doositasemega ja kontrollrühmaga. Vajaduse korral võib uuringu vältel lisada haigusseisundi seireks täiendava kontroll-loomade rühma (tavaliselt viis looma kummastki soost) (30). Täpsemad suunised uuringu kavandamise kohta, et hõlmata vahepealsed surmamised, satelliitrühmade ja kontroll-loomade kasutamine, minimeerides samal ajal kasutatud loomade üldarvu, on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

21. Kui uuringu kavas on satelliitloomi ja/või vahepealseid surmamisi, on igas vahepealseks surmamiseks ette nähtud doosirühmas tavaliselt kümme looma kummagi soo kohta, ja uuringus kasutatavate loomade üldarvu tuleks suurendada nende loomade arvu võrra, keda on kavas surmata enne uuringu lõppu. Vahepeal surmatavate ja satelliitloomade puhul tuleks üldiselt teha samad vaatlused, sh kehamassi ja sööda/vee tarbimise mõõtmised, hematoloogilised ja kliinilise biokeemia mõõtmised ning patoloogiuuringud, kui põhiuuringu kroonilise mürgisuse etapi loomade puhul, kuigi võib ka otsustada, et vahepealse surmamise rühmade puhul piirduakse konkreetsete peamiste näitajate, näiteks neurotoksilisuse või immunotoksilisuse mõõtmisega.

Doosirühmad ja doserimine

22. Juhendid kõigi doosi valiku ja doositaseme intervallidega seotud asjaolude kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7). Tuleks kasutada vähemalt kolme doosimäära ja samaaegset kontrollrühma nii kroonilise mürgisuse kui ka kantserogeensuse etapis. Doositasemed põhinevad üldjuhul lühema ajavahemiku korduvdoosi või doosipiirkonna määramise katse tulemustel ja nende puhul tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali või samalaadsete kemikaalide kohta olemasolevat toksikoloogia- ja toksikokineetikaalast teavet.

▼M4

23. Uuringu kroonilise mürgisuse etapi puhul ei pruugita vajalikuks pidada kolme doositaset hõlmavat täielikku uuringut, kui võib eeldada, et katse tegemine ühel doositasemel, mis on võrdne vähemalt 1 000 mg kehakaalu kg kohta päevas, ei põhjusta tõenäoliselt kahjulikke mõjusid. See peaks põhinema eeluuringutest saadud teabel ja kaalutlusel, et mürgisust samalaadse struktuuriga ainete andmete alusel ei eeldata. Võib kasutada piirdoosi 1 000 mg kehakaalu kg kohta päevas, välja arvatud juhul, kui inimese võimalikku kokkupuudet arvestades on vaja kasutada suuremat doositaset.
24. Kui uuritava kemikaali füüsikalised-keemilised omadused või bioloogiline mõju seda ei piira, peaks suurim doositaset olema valitud nii, et saaks määrata kindlaks peamised sihtorganid ja toksilise toime, põhjustamata siiski kannatusi, ägedat mürgisust, haigestumist või surma. Kõrgeim doositaset tuleks üldjuhul valida mürgistusnähtude tekitamiseks, mis võib seisneda näiteks kehakaalu kasvu vähenemises (ligikaudu 10 %). Sellest hoolimata võidakse uuringu eesmärkidest olenevalt (vt punkt 6) valida suurim doos, mis jääb allapoole mürgisust tõendavat doosi, näiteks kui doos avaldab teatavat kahjulikku mõju, kuid siiski ei mõjuta eluiga ega kehakaalu.
25. Doositaseme ja doositasemete intervalli võib valida nii, et määrata kindlaks mõju sõltuvus doosist, ning, olenevalt uuritava kemikaali toimeviisist, täheledatava kahjuliku toimeta kontsentratsioon (NOAEL) või muu soovitud uuringutulemus, näiteks võrdlusdoos (BMD) (vt punkt 27). Asjaolud, mida tuleks väiksemate dooside valimisel arvesse võtta, on toime doosist sõltuvuse eeldatav tõus, doosid, mis võivad põhjustada olulisi metaboliseerimise muutusi või toksilisuse toimemehhanismi muutumist, kui eeldatakse läviväärtuse olemasolu, või mille puhul eeldatakse väikeste dooside ekstrapoleerimise lähtepunkti olemasolu. Kombineeritud kantserogeensuse – kroonilise mürgisuse uuringu tegemisel on peamine eesmärk saada teavet kantserogeensuse riski hindamise jaoks ja teave kroonilise mürgisuse kohta on üldjuhul lisaeesmärk. Seda tuleks uuringu jaoks doositasemete ja doositasemete intervalli valimisel silmas pidada.
26. Doositasemete vahemik sõltub uuringu eesmärkidest ja uuritava kemikaali omadustest ning seda ei saa käesoleva katsemeetodiga üksikasjalikult ette kirjutada, aga kahe- kuni neljakordne vahemik annab sageli häid katsetulemusi, kui seda kasutatakse alanevate doositasemete määramiseks, ning dooside vahel väga suure (näiteks rohkem kui kuue- kuni kümnekordse) vahemiku kasutamise asemel on sageli parem lisada neljas katserühm. Üldiselt tuleks vältida kümnest suurema kordaja kasutamist ja kui seda tehakse, tuleks seda põhjendada.
27. Nagu juhenddokumendis nr 116 (7) on selgitatud, tuleb doosi valimisel arvesse võtta järgmist:
- doosi-toime sõltuvuse teadaolev või oletatav mittelineaarsus või murdepunkt;
 - toksikokineetika ja doosipiirkonnad, mille puhul esineb metaboolne induktioon, küllastumine või väliste ja sisemiste dooside vaheline mittelineaarsus või seda ei esine;
 - eellasaine põhjustatud kahjustused, toimetähtsused või märgid sellest, et tuleb arvesse võtta peamiste bioloogiliste alusprotsesside toimumist;

▼M4

- peamised (või oletatavad) toimeviisi asjaolud, näiteks annused, mille juures hakkab suureneva tsütotoksilisus, mõjutatakse hormoonitasemeid, homeostaasi säilitamise mehhanismid saavad üle koormatud jne;
- mõju doosist sõltuvuse kõvera piirkonnad, kus on vaja eriti usaldusväärset hinnangut, näiteks eeldatava võrdlusdoosi (BMD) vahemikus või oletatava läviväärtuse juures;
- inimeste kokkupuute eeldatava tasemega seotud kaalutlused, eriti keskmiste ja väiksemate dooside valimisel.

28. Kontrollrühm on rühm, kellega katseid ei tehta, või kandeaine kontrollrühm, kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui katserühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui kasutatakse kandeainet, saab kontrollrühm kandeainet kõige suuremas koguses, mida kasutatakse doosirühmades. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga ja katseloomad söövad seda sööda halvema maitse tõttu oluliselt vähem, võib asjakohasema kontrollrühma tagamiseks olla sobiv täiendav kontrollrühm, kes saab samapalju sööta, kui doosirühmas ära süüakse.

Dooside ettevalmistamine ja uuritava kemikaali manustamine

29. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt suu kaudu koos sööda või joogiveega või kurgusondiga. Lisateave manustamisteede ja -meetodite kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7). Manustamistee ja -meetod sõltub uuringu eesmärgist, uuritava kemikaali füüsikalistest ja keemilistest omadustest, biosaadavusest ning inimese uuritava kemikaaliga kokkupuutumise peamisest teest ja viisist. Manustamistee ja -meetodi valikut tuleks põhjendada. Loomade heaolu huvides tuleks suukaudne manustamine kurgusondiga üldiselt valida ainult selliste ainete jaoks, mille puhul see manustamistee ja -meetod on põhjendatult sarnane inimese võimaliku kokkupuutega kemikaaliga (näiteks ravimid). Toidu- või keskkonnakemikaalide puhul, sh pestitsiidide puhul toimub manustamine tavaliselt sööda või joogivee kaudu. Mõne stsenaariumi puhul, näiteks kokkupuute töökohal, võib olla asjakohasem manustada kemikaali muul viisil.
30. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Vastavalt vajadusele tuleks arvesse võtta järgmisi kandeaine ja muude lisandite omadusi: mõju uuritava aine imendumisele, jaotumisele, metaboliseerimisele või retentsioonile; mõju uuritava kemikaali keemilistele omadustele, mis võivad muuta selle toksilisi omadusi, ning mõjud sööda või vee tarbimisele või loomade toitumisele. Soovitatakse, et võimaluse korral tuleks kõigepealt kasutada vesilahust-/suspensiooni, seejärel õlilahust/-emulsiooni (nt maisiõli) ja siis lahustamist muudes kandeainetes. Muu kandeaine kui vee puhul tuleks teada kandeaine mürgiseid omadusi. Tuleks teada uuritava kemikaali stabiilsust ning doseerimislahuste või sööda (nagu on asjakohane) homogeensust manustamise tingimustes (näiteks söödaga).
31. Nende kemikaalide puhul, mida manustatakse sööda või joogiveega, on oluline tagada, et sisseantavad uuritava kemikaali kogused ei muudaks tavalist toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Pikas mürgisuse uuringus, kus kemikaali manustatakse sööda kaudu, ei tohiks uuritava kemikaali kontsentratsioon söödas üldiselt olla suurem kui 5 % sööda üldkogusest, et vältida tasakaalustamata toitumist. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni söödas (mg sööda kg kohta või ppm) või püsivat doositaset looma kehamassi alusel (mg kehakaalu kg kohta), mis arvutatakse iga nädal. Tuleks täpsustada, millist võimalust kasutatakse.

▼M4

32. Suukaudse manustamise korral manustatakse loomadele uuritavat kemikaali iga päev (seitse päeva nädalas) 12 kuu jooksul (kroonilise mürgisuse etapp) või 24 kuu jooksul (kantserogeensuse etapp), vt ka punktid 33 ja 34. Iga muu doseerimismeetodi, nt viis päeva nädalas, kasutamist tuleb põhjendada. Nahakaudse manustamise puhul töödeldakse loomi uuritava kemikaaliga tavaliselt 12 kuu jooksul (kroonilise mürgisuse etapp) vähemalt kuus tundi päevas seitse päeva nädalas, nagu on täpsustatud käesoleva lisa peatükis B.9 (11), või 24 kuu jooksul (kantserogeensuse etapp). Sissehingamise teel toimuv kokkupuude toimub kuus tundi päevas ja seitse päeva nädalas; võib kasutada ka kokkupuudet viiel päeval nädalas, kui see on põhjendatud. Kokkupuuteperiood on tavaliselt 12 kuud (kroonilise mürgisuse etapp) või 24 kuud (kantserogeensuse etapp). Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu näriliseligi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Kui päevas kasutatakse alla kuuetunnist kokkupuute kestust, tuleks seda põhjendada. Vt ka käesoleva lisa peatükk B.8 (9).
33. Kui loomadele manustatakse uuritavat kemikaali sundsöötmisega, tuleks seda teha iga päev umbes samal kellaajal maosondi või sobiva intubatsiooni abil. Üldiselt manustatakse üks annus üks kord päevas; kui aga kemikaal on näiteks lokaalne ärritaja, võib igapäevase doosimäära säilitada, manustades jaotatud annust (kaks korda päevas). Suurim vedelikukogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus peaks olema nii väike kui praktiliselt võimalik ega tohiks üldjuhul näriliste puhul ületada 1 ml kehamassi 100 g kohta (31). Katses kasutatava mahu erinevusi tuleks vähendada miinimumini; püsiva mahu tagamiseks tuleks kõikidel doositasemetel kasutada erinevaid kontsentratsioone. Erandiks on võimaliku söövitava või ärritava mõjuga kemikaalid, mida tuleb tugeva paikse mõju vältimiseks lahjendada. Tuleks vältida katseid kontsentratsioonidel, mis tõenäoliselt võivad seedetrakti söövitada või ärritada.

Uuringu kestus

34. Käesoleva uuringu kroonilise mürgisuse etapi annustamise ajavahemik ja kestus on tavaliselt 12 kuud, kuigi uuringu kava võimaldab teha ka lühemaid (näiteks kuus või üheksa kuud) või pikemaid (näiteks 18 või 24 kuud) uuringuid, olenevalt konkreetsetest eeskirjadest või teatavatest toimetehhanismiga seotud eesmärkidest. Kõrvalekaldeid 12-kuulisest kokkupuute kestusest tuleks põhjendada, eelkõige lühema kestuse puhul. Kõik kõnealusele etapile määratud doosirühmad surmatakse määratud ajal kroonilise mürgisuse ja uudismoodustistega mitteseotud patoloogia hindamiseks. Uuritava kemikaali põhjustatud toksikoloogiliste muutuste pöördumise jälgimiseks kasutatavaid satelliitrühmi tuleks pärast kokkupuute lõpetamist hoida ilma annustamiseta vähemalt neli nädalat ja mitte rohkem kui kolmandiku uuringu kogukestusest.
35. Kantserogeensuse uuringu kestus on näriliste puhul tavaliselt 24 kuud, mis moodustab suurema osa kasutatavate loomade tavalisest elueast. Võib kasutada lühemat või pikemat uuringu kestust, olenevalt uuringus kasutatava loomaliigi liini elueast, aga seda tuleks põhjendada. Konkreetsete hiireliimide puhul, näiteks liin AKR/J, C3H/J või C57BL/6J, võib asjakohasem olla 18kuuline kestus. Allpool on esitatud suunised uuringu kestuse ja lõpetamise ning ellujäämuse kohta; täpsemad suunised, sh uuringus ellujäämusega võrreldes negatiivse kantserogeensuse lubatavuse kaalumise, on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7).

▼ M4

- Kui väiksema doosi rühmade või kontrollrühma ellujäänute arv langeb alla 25 %, tuleks kaaluda uuringu lõpetamist.
- Kui mürgistuse tõttu sureb enneaegselt ainult suure doosi rühm, ei tohiks selle pärast uuringut lõpetada.
- Kummagi soo ellujäämist tuleks arvesse võtta eraldi.
- Uuringut ei tohiks pikendada selle ajavahemikuni, kus uuringut saadavad andmed ei ole enam piisavad statistiliselt kehtivate hinnangute andmiseks.

VAATLUSED (KROONILISE MÜRGISUSE ETAPP)

36. Kõiki loomi tuleks haigestumise või suremise suhtes kontrollida, tavaliselt iga päeva alguses ja lõpus, sh nädalavahetustel ja pühadel. Vähemalt üks kord päevas tuleks teha üldine kliiniline läbivaatus, eelistatavalt igal päeval samal ajal / samadel aegadel, arvestades kunstliku manustamise puhul eeldatava mõju kõrgeraadi pärast doseerimist.
37. Kõik loomad tuleks üksikasjalikult kliiniliselt läbi vaadata vähemalt kord enne esimest kokkupuudet (et võimaldada iga katselooma seisundi muutumise võrdlusi), uuringu esimese nädala lõpus ja seejärel iga kuu. Vaatlused tuleks korraldada nii, et üksikute vaatlejate vahelised erinevused oleksid minimeeritud ega sõltuks katserühmast. Need vaatlused tuleks teha väljaspool puuri, eelistatavalt selleks ette nähtud kohas ja iga kord samal ajal. Tulemused tuleks hoolikalt üles märkida, kasutades selleks võimaluse korral katselabori selgelt kindlaks määratud hindamissüsteeme. Tuleks püüda tagada, et vaatlustingimuste varieeruvus oleks minimaalne. Üles tuleks märkida vähemalt järgmised tunnused: muutused nahal, karvastikus, silmades, limaskestal, eritiste esinemine ning autonoomsed muutused (nt pisaravool, turris karv, pupillide suurus, muutunud hingamine). Samuti tuleks üles märkida muutused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad endaga ümberkäimisele reageerivad, kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid (nt ülemäärane karvastiku hooldamine, ringiratast keerlemine) või kummaline käitumine (nt enese vigastamine, tagurpidi liikumine) (32).
38. Enne uuritava kemikaali esmakordset manustamist tuleks oftalmoskoobi või muu sobiva seadme abil teha kõikide loomade oftalmoloogiline kontroll. Pärast uuringu lõppu tuleks kõnealune kontroll teha eelistatavalt kõikidele loomadele, kuid vähemalt suure doosi rühma ja kontrollrühma loomadele. Kui silmades avastatakse muutusi, tuleb läbi vaadata kõik loomad. Kui struktuurianalüüs või muu teave viitab mürgisusele silmade suhtes, tuleks silmi kontrollida sagedamini.
39. Kui kemikaali varasem korduvannuse 28-päevane ja/või 90-päevane mürgisuse uuring näitas võimalikku neurotoksilist mõju, võib soovi korral enne uuringu algust ja kolmekuuliste ajavahemike järel pärast uuringu algust kuni 12 kuuni (kaasa arvatud) ning samuti uuringu lõpus (kui uuring kestab kauem kui 12 kuud) uurida sensoorset reageerimist erinevat tüüpi stiimulitele (32) (näiteks helilised, visuaalsed ja propriotseptiivsed stiimulid) (33, 34, 35), hinnata haardetugevust (36) ja motoorset tegevust (37). Võimalike meetodite täpsemad üksikasjad on esitatud vastavates viidetes. Siiski võib kasutada ka muid meetodeid kui need, millele viidatakse.

▼ **M4**

40. Sellise kemikaali puhul, mille varasem korduvannuse 28-päevane ja/või 90-päevane mürgisuse uuring näitas immunotoksilise mõju võimalikkust, võib soovi korral teha uuringu lõpul kõnealuse näitaja täiendavaid uuringuid.

Kehamass, sööda ja vee tarbimine ning söödakasutuse tõhusus

41. Kõiki loomi tuleks kaaluda kemikaali manustamise alguses, vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Sööda tarbimist ja söödakasutuse tõhusust tuleks mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ning seejärel vähemalt kord kuus. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleks vee tarbimist mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Joogivee tarbimise mõõtmisi tuleks kaaluda ka uuringute puhul, milles muutub loomade joomiskäitumine.

Hematoloogia ja kliiniline biokeemia

42. Näriliste uuringutes tuleks hematoloogilised uuringud teha kõikidele katseloomadele (kümme isas- ja kümme emaslooma rühma kohta) kolme, kuue ja 12 kuu möödumisel ning samuti uuringu lõpus (kui uuring kestab kauem kui 12 kuud). Hiirte puhul võib kõikide nõutavate hematoloogiliste näitajate määramiseks minna vaja satelliitloomi (vt punkt 19). Muude loomade kui näriliste uurimisel võetakse proovid väiksemalt arvult loomadelt (koerte uurimisel näiteks neljalt loomalt kummagi soo ja iga rühma kohta) vahepealsetel proovivõtu aegadel ja uuringu lõpus, nagu on kirjeldatud näriliste puhul. Kui võrreldavate doositasemetega tehtud varasema 90-päevase uuringu vältel ei tuvastatud mõju hematoloogilistele parameetritele, ei ole kolme kuu möödumisel vaja mõõtmisi teha ei näriliste ega muude loomade puhul. Vereproovid tuleks võtta määratud kohast, näiteks otse südamest või retroorbitaalset siinusest, kasutades tuimestust.
43. Tuleks uurida järgmisi parameetreid (38): leukotsüütide üldarv ja diferentseeritud leukotsüüdiarvud, erütrotsüütide arv, vereliistakute arv, hemoglobiini kontsentratsioon, hematokrit (rakkude protsent vere üldmahus), erütrotsüütide keskmine maht (MCV), hemoglobiini keskmine kogus erütrotsüüdis (MCH), hemoglobiini keskmine kontsentratsioon erütrotsüüdis (MCHC), protrombiiniaeg ja aktiveeritud osalise tromboplastiini aeg. Vajaduse korral võib mõõta muid hematoloogiaparameetreid, näiteks Heinzi kehakesi või muid atüüpilisi erütrotsüüdivorme või methemoglobiini, olenevalt uuritava kemikaali mürgisusest. Üldiselt tuleks kasutada paindlikku lähenemisviisi sõltuvalt konkreetse uuritava kemikaali puhul täheldatud ja/või eeldatavast mõjust. Kui uuritav kemikaal mõjutab vere loomesüsteemi, võib olla vajalik uurida samuti retikulotsüütide arvu ja lüüdi tsütoloogiat, kuigi need uuringud ei ole alati vajalikud.
44. Olulise kudesid kahjustava toksilise mõju ning eelkõige neerusid ja maksa kahjustava mõju uurimiseks tehakse kliinilise biokeemia analüüsid vereproovidega, mis on võetud kõikidelt katseloomadelt (kümnel isas- ja kümnel emasloomalt rühma kohta) samade ajavahemike järel, mis on ette nähtud hematoloogiliste uuringute puhul. Hiirte puhul võib kõikide nõutavate kliinilise biokeemia näitajate määramiseks minna vaja satelliitloomi. Muude loomade kui näriliste uurimisel võetakse proovid väiksemalt arvult loomadelt (koerte uurimisel näiteks neljalt loomalt kummagi soo ja iga rühma kohta) vahepealsetel proovivõtu aegadel ja uuringu lõpus, nagu on kirjeldatud näriliste puhul. Kui võrreldavate doositasemetega tehtud varasema 90-päevase uuringu vältel ei tuvastatud mõju kliinilise biokeemia parameetritele, ei ole kolme kuu möödumisel vaja mõõtmisi teha ei näriliste ega

▼ **M4**

muude loomade puhul. Enne vereproovi võtmist on soovitatav loomi (v.a hiired) öö jooksul näljutada ⁽¹⁾. Tuleks uurida järgmisi parameetreid (38): glükoos, karbamiid (karbamiidlämmastik), kreatiniin, üldvalk, albumiin, kaltsium, naatrium, kaalium, üldkolesterool, vähemalt kaks asjakohast hepatotsellulaarse hindamise katset (alaniinaminotransferaas, aspartaataminotransferaas, glutamaatdehüdrogenaas, sapphapete kogusisaldus) (39) ja vähemalt kaks asjakohast hepatobiliaarse hindamise katset (aluseline fosfataas, γ -glutamüültransferaas, 5'-nukleotidaas, üldbilirubiini, sapphapete kogusisaldus) (39). Muud kliinilisi keemilisi parameetreid, näiteks triglütseriide paastutingimustes, teatavaid hormone ja koliinesteraasi võib mõõta vastavalt vajadusele, olenemalt uuritava kemikaali mürgisusest. Üldiselt on vaja paindlikku lähenemisviisi sõltuvalt uuritava kemikaali täheldatud ja/või oletatavast mõjust.

45. Uriinianalüüsi näitajad tuleks määrata kõikidel katseloomadel (kümnel isas- ja kümnel emasloomal rühma kohta) proovidest, mis on kogutud samade vahemikega kui hematoloogia- ja kliinilise keemia proovid. Kui võrreldavate doositasemetega tehtud varasema 90-päevase uuringu ajal ei leitud uriinianalüüsil mingit mõju, ei ole kolme kuu möödumisel vaja mõõtmisi teha. Kliinilise patoloogia uuringute eksperdi soovitusel (38) kohaselt tuleks määrata järgmised parameetrid: välimus, ruumala, osmolaalsus või suhteline tihedus, pH, üldvalk ja glükoos. Lisaks võib määrata ketoone, urobilinogeeni, bilirubiini ja peitverd. Kui täheldatud mõju on vaja laialdasemalt uurida, võib vajaduse korral määrata täiendavaid näitajaid.
46. Üldiselt arvatakse, et hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia näitajate lähteväärtused on vaja enne kemikaali manustamist määrata koertega tehtavate uuringute puhul, kuid närilistega tehtavate uuringute puhul neid määrata vaja ei ole (38). Kui varem määratud lähteväärtused (vt punkt 58) ei ole õiged, tuleks kaaluda selliste väärtuste määramist.

PATOLOOGIA

Täielik lahkamine

47. Kõik uuringus kasutatud loomad läbivad tavaliselt täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki avasid, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisaldist. Siiski võib ka ette näha, et mõõtmised piirduvad (vahepeal surmatud või satelliitrühma loomade puhul) kõige olulisemate, näiteks neurotoksilisuse või immunotoksilisuse näitajate määramisega (vt punkt 21). Selliseid loomi ei ole vaja lahata ja nendega teha järgmistes punktides kirjeldatud protseduure. Kontrollloomade puhul võib uuringu juht konkreetsel juhul otsustada, kas lahkamine on vajalik.

⁽¹⁾ Mitmete seerumi ja plasma, eelkõige glükoosi mõõtmiste korral oleks eelistatav loomadele eelneva öö jooksul süüa mitte anda. Selle peamine põhjendus on see, et söötmise korral oleks tulemuste varieeruvus suurem ning see varjaks raskemini tuvastatava toime ning muudaks tõlgendamise raskeks. Kuid tuleb märkida, et öö läbi söötmata hoidmine võib häirida loomade tavalist üldist ainevahetust ja eelkõige söödaga manustamise uuringute puhul võib see häirida igapäevast kokkupuudet uuritava kemikaaliga. Kõiki loomi tuleks hinnata samas füsioloogilises seisundis ja seepärast tuleks üksikasjalikud või neuroloogilised hindamised määrata muule päevale kui kliinilise biokeemia proovide võtmise päev.

▼ **M4**

48. Kõikide loomade puhul, v.a loomad, kellele on tehtud erand punkti 47 viimases osas, tuleks määrata organite mass. Kõigi loomade (välja arvatud loomad, kes leitakse suremas ja/või surmataakse uuringu kestel) neerupealised, aju, munandimanused, süda, neerud, maks, munasarjad, põrn, munandid, kilpnääre (mis kaalutakse pärast fikseerimist koos kõrvakilpnäärmetega) ja emakas tuleks puhastada kõigist nende küljes olevatest kudedest, nagu on asjakohane, ja kaaluda märjalt võimalikult kiiresti pärast lahkamist, et vältida organite kuivamist.
49. Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu (vt punkt 40) seisukohast kõige sobivamas fikseerimiskeskonnas (kandilistes sulgudes esitatud organite uuring ei ole kohustuslik):

Kõik silmaga nähtavad kahjustused	Süda	Kõhunääre	Magu (eesmagu, mao näarmeline osa)
Neerupealis	Niudesool	Kõrvakilpnääre	[Hambad]
Aort	Tühisool	Perifeerne närv	Munandid
Aju (sh suuraju osad, väikeaju ning piklikaju/sild)	Neerud	Ajuripats	Harknääre
Umbsool	Pisaranääre (eksorbitaalne)	Eesnääre	Kilpnääre
Emakakael	Maks	Pärasool	[Keel]
Koagulatsiooninääre	Kops	Süljenääre	Hingetoru
Käärsool	Lümfisõlmed (nii pealispinnalt kui ka sügavalt)	Seemnepõiekesed	Kusepõis
Kaksteistsõrmiksool	Piimanääre (kohustuslik emaste puhul ja kui see on nähtavalt lõigatav, siis isaste puhul)	Skeletilihas	Emakas (sh emakakael)
Munandimanus	[Ülemised hingamisteed, sh nina, ninakarbid ja nina kõrvalkoopad]	Nahk	[Kusejuha]
Silm (sh võrkkest)	Söögitoru	Seljaaju (kolmel tasandil: kaela-, rinna- ja nimmepiirkond)	[Kusiti]
[Reieluu koos liigesega]	[Haistmissibul]	Põrn	Tupp
Sapipõis (muud liigid kui rott)	Munasarjad	[Rinnak]	Luuüdi lõige ja/või värske luuüdi aspiraati
Harderi nääre			

▼ **M4**

Paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks säilitada mõlemad organid. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Säilitada tuleks ka muud organid, mis uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt võivad tõenäoliselt olla sihtorganid. Nahakaudse manustamise uuringute puhul tuleks uurida neid organeid, mis on ette nähtud suukaudse manustamise puhul, ning väga vajalik on manustamiskohast nahaproovide võtmine ja säilitamine. Inhalatsiooniuringute korral tuleks hingamisteedest säilitatavate ja uuritavate kudede puhul järgida käesoleva lisa peatükkide B.8 (9) ja B.29 (10) soovitusi. Muude organite/kudede puhul (ja lisaks hingamisteedest pärit konkreetset säilitatavatele kudede) tuleks järgida suukaudse manustamise puhul esitatud organite nimekirja.

Histopatoloogia

50. On avaldatud juhendid toksikoloogilise patoloogia uuringute tegemise parimate tavade kohta (40). Tuleb teha vähemalt järgmised histopatoloogilised uuringud:

- suure annuse ja kontrollrühmade loomade kõik koed;
- uuringu vältel surnud või surmatud loomade kõik koed;
- kõik koed, milles täheldatakse makroskoopilisi anomaaliaid;
- sihtkoed või koed, mille puhul suure annuse rühmas on näha kokkupuutest tingitud muutusi, kõikidelt suure annuse rühmade loomadelt;
- paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks uurida mõlemat organit.

VAATLUSED (KANTSEROGEENSUSE FAAS)

51. Kõiki loomi tuleks haigestumise või suremise suhtes kontrollida, tavaliselt iga päeva alguses ja lõpus, sh nädalavahetustel ja pühadel. Loomi tuleks samuti kord päevas kontrollida toksikoloogiliselt oluliste nähtude suhtes. Sundtoitmise uuringute puhul tuleks loomi kontrollida vahetult doosi manustamisele järgneval ajavahemikul. Erilist tähelepanu tuleks pöörata kasvujate tekkimisele; iga nähtava või palpeeritava tuumori kohta tuleb märkida ilmumise aeg, paiknemine, mõõtmed, välimus ja areng.
52. Kõiki loomi tuleks kaaluda kemikaali manustamise alguses, vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Sööda tarbimist ja söödakasutuse tõhusust tuleks mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ning seejärel vähemalt kord kuus. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleks vee tarbimist mõõta vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala vältel ja seejärel vähemalt kord kuus. Joogivee tarbimise mõõtmise tuleks kaaluda ka uuringute puhul, milles muutub loomade joomiskäitumine.

▼ **M4***Hematoloogilised, kliinilise biokeemia ja muud mõõtmised*

53. Uuringust saadava teabe, eelkõige toimeviisiga seotud teabe maksimeerimiseks tuleks uuringu juhi äranägemise järgi võtta hematoloogiliste ja kliinilise biokeemia analüüside jaoks vereproove. Samuti võib olla asjakohane uriinianalüüsi tegemine. Kõnealuste parameetrite kohta saab teavet kroonilise mürgisuse etapis, mille kestus on tavaliselt 12 kuud (punkt 34), kasutatud loomade andmetest. Täpsemad juhendid kantserogeensuse uuringu käigus kõnealuste proovide võtmise väärtuse kohta on esitatud juhenddokumendis nr 116 (7). Kui vereproovid võetakse, tuleb seda teha katseperioodi lõpus vahetult enne loomade tapmist või selle käigus. Vereproovid tuleks võtta määratud kohast, näiteks otse südamest või retroorbitaalsest siinusest, kasutades tuimestust. Uurimiseks võib samuti valmistada vere äigepreparaadid, eelkõige juhul, kui luuüdi näib olevat sihtorgan, kuigi kantserogeensuse etapil vere äigepreparaatide uurimise väärtus kantserogeense/onkogeense mõju hindamiseks on küsitav (38).

PATOLOOGIA

Täielik lahkamine

54. Kõik uuringus kasutatud loomad, v.a kontroll-loomad (vt punkt 20) ja muud satelliitühma loomad, läbivad täieliku, põhjaliku lahkamise, milles uuritakse põhjalikult keha välispinda, kõiki avasid, kolju-, rinna- ja kõhuõõnt ja nende sisaldist. Kontroll-loomade ja muude satelliitühma loomade puhul võib uuringu juht konkreetsel juhul otsustada, kas lahkamine on vajalik. Organite massi kantserogeensuse uuringutes tavaliselt ei määrata, kuna geriaatrilised muutused ja hilisematel etappidel kasvajate areng piirab organite massi andmete kasulikkust. Kõnealused andmed võivad siiski olla üliolulised tõendusmaterjali kaalukuse hindamisel ja eelkõige toimeviisi hindamisel. Kui satelliituuringus seda määratakse, tuleks kõnealused andmed koguda hiljemalt aasta möödumisel uuringu algusest.
55. Järgmisi kudesid tuleks hoida koetüübi ja kavandatava histopatoloogilise uuringu (vt punkt 40) seisukohast kõige sobivamas fikseerimiskeskonnas (kandilistes sulgudes esitatud organite uuring ei ole kohustuslik):

Kõik silmaga nähtavad kahjustused	Süda	Kõhunääre	Magu (eesmagu, mao näärme osa)
Neerupealis	Niudesool	Kõrvalkilpnääre	[Hambad]
Aort	Tühisool	Perifeerne närv	Munandid
Aju (sh suuraju osad, väikeaju ning piklikaju/sild)	Neerud	Ajuripats	Harknääre
Umbsool	Pisaranääre (eksoorbitaalne)	Eesnääre	Kilpnääre
Emakakael	Maks	Pärasool	[Keel]
Koagulatsiooninäär	Kops	Süljenääre	Hingetoru
Käärsool	Lümfisõlmed (nii pealispinnalt kui ka sügavalt)	Seemnepõiekesed	Kusepõis

▼ M4

Kaksteistsõrmiksool	Piimanääre (kohustuslik emaste puhul ja kui see on nähtavalt lõigatav, siis isaste puhul)	Skeletilihask	Emakas (sh emakakael)
Munandimanus	[Ülemised hingamisteed, sh nina, ninakarvikud ja nina kõrvalkoopad]	Nahk	[Kusejuha]
Silm (sh võrkkest)	Söögitoru	Seljaaju (kolmel tasandil: kaela-, rinna- ja nimmepiirkond)	[Kusiti]
[Reieluu koos liigesega]	[Haistmissibul]	Põrn	Tupp
Sapipõis (muud liigid kui rott)	Munasarjad	[Rinnak]	Luuüdi lõige ja/või värske luuüdi aspiraati
Harderi nääre			

Paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks säilitada mõlemad organid. Kliinilised ja muud leiud võivad osutada vajadusele uurida ka muid kudesid. Säilitada tuleks ka muud organid, mis uuritava kemikaali teadaolevatest omadustest tulenevalt võivad tõenäoliselt olla sihtorganid. Nahkaudse manustamise uuringute puhul tuleks uurida neid organeid, mis on ette nähtud suukaudse manustamise puhul, ning väga vajalik on manustamiskohast nahaproovide võtmine ja säilitamine. Inhalatsiooniuringute korral tuleks hingamisteedest säilitatavate ja uuritavate kudede puhul järgida käesoleva lisa peatükkide B.8 (8) ja B.29 (9) soovitusi. Muude organite/kudede puhul (ja lisaks hingamisteedest pärit konkreetsetelt säilitatavatele kudede) tuleks järgida suukaudse manustamise puhul esitatud organite nimekirja.

Histopatoloogia

56. On avaldatud juhendid toksikoloogilise patoloogia uuringute tegemise parimate tavade kohta (40). Tuleb teha vähemalt järgmised histopatoloogilised uuringud:

- suure annuse ja kontrollrühma loomade kõik koed;
- uuringu vältel surnud või surmatud loomade kõik koed;
- kõik koed, milles täheldatakse makroskoopilisi anomaaliaid, kaasa arvatud kasvaja;
- kui suure doosi rühmas täheldatakse uuritava kemikaaliga kokkupuutest tingitud histopatoloogilisi muutusi, kontrollitakse kõikide muude doosirühmade loomadel samu kudesid;
- paarisorganite puhul (näiteks neerud, neerupealised) tuleks uurida mõlemat organit.

▼ **M4****ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE (KANTSERO-GEENSUS JA KROONILINE MÜRGISUS)****Andmed**

57. Kõigi hinnatavate parameetrite kohta tuleks esitada iga looma andmed. Lisaks sellele tuleks kõik andmed koondada tabelisse, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, katse ajal sumud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arv, mürgistusnähtudega loomade arv, täheldatud mürgistusnähtude kirjeldus, sealhulgas mürgise toime ilmumine, kestus, raskusaste, kahjustustega loomade arv, kahjustuste liik ja iga liiki kahjustuse kohta nende loomade protsent, kellel seda esines. Kokkuvõtlikes tabelites tuleks esitada (pidevalt mõõdetud katseandmete puhul) nende loomade keskmised ja standardhälbed, kellel täheldati mürgisuse mõju või kahjustusi, lisaks kahjustuse raskusastme määramisele.
58. Varasemad kontrolli andmed võivad aidata uuringu tulemusi tõlgendada, näiteks kui samaaegse kontrolli andmed erinevad oluliselt sama katsekorralduse juures kontrollrühma loomadelt saadud hiljutistest andmetest. Hindamiseks võetud varasemad kontrolli andmed peaksid pärinema samast laborist, olema saadud sama vanuserühma ja sama liini loomadega ning olema kogutud kõnealusele uuringule eelneva viie aasta jooksul.
59. Võimaluse korral tuleks numbrilisi tulemusi hinnata asjakohase ja üldiselt tunnustatud statistilise meetodiga. Statistilised meetodid ja analüüsitavad andmed tuleks valida uuringu kavandamise etapis (punkt 9). Sellisel valimisel tuleks vajaduse korral ette näha, et tulemusi tuleb kohandada ellujäämise määra arvestamiseks.
60. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

- füüsikaline olemus, puhtus ja füüsikalised-keemilised omadused;
- tunnusandmed;
- kemikaali päritolu;
- partii number;
- keemilise analüüsi sertifikaat.

Kandeaine (vajaduse korral):

- kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

Katseloomad:

- kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;
- loomade arv, vanus ja sugu katse alguses;
- päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;
- iga looma kaal katse alguses.

▼ M4*Katsetingimused:*

- manustamistee ja annuse valiku põhjendus;
- kui see on kohaldatav, siis andmete analüüsimiseks valitud statistilised meetodid;
- andmed uuritava kemikaali preparaadi/sööda valmistamise kohta;
- analüüsiandmed preparaadis saavutatud kontsentratsiooni, preparaadi stabiilsuse ja homogeensuse kohta;
- manustamistee ja uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- inhalatsiooniuringute puhul: kas manustamine toimub ainult nina või kogu keha kaudu;
- tegelik doos (mg kehakaalu kg kohta päevas) ja vajaduse korral ümberarvestustegur söödas või joogivees oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (mg/kg või ppm) ja tegeliku doosi vahel;
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad.

Tulemused (tuleks esitada kokkuvõtlikud tabelandmed ja andmed eraldi iga looma kohta)

Üldosa:

- ellujäämuse andmed;
- kehamass / kehamassi muutused;
- sööda tarbimine, söödakasutuse tõhususe arvutused (kui need tehti) ja vee tarbimine (kui on kohaldatav);
- toksiko-kineetilised andmed võimaluse korral;
- oftalmoskoopia võimaluse korral;
- hematoloogia andmed võimaluse korral;
- kliinilise keemia andmed võimaluse korral.

Kliinilised leiud:

- toksilisuse tunnused;
- iga anomaalia esinemissagedus (ja kui määrati, siis raskusaste);
- kliiniliste ilmingute laad, raskus ja kestus (sõltuvalt sellest, kas ilmingud on ajutised või püsivad).

Lahanguandmed:

- kehamass surmamisel;
- organite mass (ja kui võimalik, siis organi massi / kehamassi suhe);
- lahkamise leiud; anomaaliate esinemissagedus ja raskusaste.

Histopatoloogia:

- uudismoodustistega mitteseotud histopatoloogilised leiud;
- uudismoodustistega seotud histopatoloogilised leiud;

▼ **M4**

- korrelatsioon makroskoopiliste ja mikroskoopiliste leidude vahel;
- kõigi kemikaaliga kokkupuutest tingitud histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus koos raskusastme hindamisega;
- aruanne mikroskoobipreparaatide võimalike vastastikuste hindamiste kohta.

Vajaduse korral tulemuste statistiline töötlus.

Tulemuste arutelu:

- võimaliku modelleerimislähenemisviisi arutelu;
- toime sõltuvus doosist;
- varasemad kontrolli andmed;
- võimalikku toimeviisi käsitleva teabe analüüsimine;
- võrdlusdoosi (BMD), täheldatava kahjuliku toimeteta doosi (NOAEL) või vähima täheldatava kahjuliku toimega doosi (LOAEL) kindlaksmääramine;
- asjakohasus inimeste puhul.

Järeldused

KIRJANDUS

- 1) OECD (1995). Report of the Consultation Meeting on Sub-chronic and Chronic Toxicity/Carcinogenicity Testing (Rome, 1995), internal working document, Environment Directorate, OECD, Paris.
- 2) EPA (2005). Guidelines for Carcinogen Risk Assessment Risk Assessment Forum U.S. Environmental Protection Agency Washington, DC.
- 3) Combes RD, Gaunt I, Balls M (2004). A Scientific and Animal Welfare Assessment of the OECD Health Effects Test Guidelines for the Safety Testing of Chemicals under the European Union REACH System. ATLA 32: 163–208.
- 4) Barlow SM, Greig JB, Bridges JW et al (2002). Hazard identification by methods of animal-based toxicology. Food. Chem. Toxicol. 40: 145–191.
- 5) Chhabra RS, Bucher JR, Wolfe M, Portier C (2003). Toxicity characterization of environmental chemicals by the US National Toxicology Programme: an overview. Int. J. Hyg. Environ. Health 206: 437–445.
- 6) Käesoleva lisa peatükk B.27 „Korduvdoosi suukaudse mürgisuse 90-päevane uuring mittenäriliste puhul”.
- 7) OECD (2012). Guidance Document on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453 – Second edition. Series on Testing and Assessment No. 116, available on the OECD public website for Test Guideline at www.oecd.org/env/testguidelines.
- 8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- 9) Käesoleva lisa peatükk B.8 „Subakuutne mürgisus sissehingamisel: 28-päevane uuring”.
- 10) Käesoleva lisa peatükk B.29 „Subkrooniline mürgisus sissehingamisel: 90-päevane uuring”.
- 11) Käesoleva lisa peatükk B.9 „Kordusdoosi mürgisus (28 päeva, naha-kaudne)”.

▼ **M4**

- 12) Boobis AR, Cohen SM, Dellarco V, McGregor D, Meek ME, Vickers C, Willcocks D, Farland W (2006). IPCS Framework for analyzing the Relevance of a Cancer Mode of Action for Humans. *Crit. Rev. in Toxicol*, 36:793–801.
- 13) Cohen SM, Meek ME, Klaunig JE, Patton DE, Fenner-Crisp PA (2003). The human relevance of information on carcinogenic Modes of Action: An Overview. *Crit. Rev. Toxicol*. 33:581–589.
- 14) Holsapple MP, Pitot HC, Cohen SN, Boobis AR, Klaunig JE, Pastoor T, Dellarco VL, Dragan YP (2006). Mode of Action in Relevance of Rodent Liver Tumors to Human Cancer Risk. *Toxicol. Sci*. 89:51–56.
- 15) Meek EM, Bucher JR, Cohen SM, Dellarco V, Hill RN, Lehman-McKemmon LD, Longfellow DG, Pastoor T, Seed J, Patton DE (2003). A Framework for Human Relevance analysis of Information on Carcinogenic Modes of Action. *Crit. Rev. Toxicol*. 33:591–653.
- 16) Carmichael NG, Barton HA, Boobis AR *et al.* (2006). Agricultural Chemical Safety Assessment: A Multisector Approach to the Modernization of Human Safety Requirements. *Crit. Rev. Toxicol*. 36, 1–7.
- 17) Barton HA, Pastoor TP, Baetcke T *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments. *Crit. Rev. Toxicol*. 36: 9–35.
- 18) Doe JE, Boobis AR, Blacker A *et al.* (2006). A Tiered Approach to Systemic Toxicity Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol*. 36: 37–68.
- 19) Cooper RL, Lamb JS, Barlow SM *et al.* (2006). A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment. *Crit. Rev. Toxicol*. 36: 69–98.
- 20) OECD (2002). Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Series on Testing and Assessment No. 35 and Series on Pesticides No. 14, ENV/JM/MONO(2002)19, OECD, Paris.
- 21) OECD (2000). Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- 22) Rhomberg LR, Baetcke K, Blancato J, Bus J, Cohen S, Conolly R, Dixit R, Doe J, Ekelman K, Fenner-Crisp P, Harvey P, Hattis D, Jacobs A, Jacobson-Kram D, Lewandowski T, Liteplo R, Pelkonen O, Rice J, Somers D, Turturro A, West W, Olin S (2007). Issues in the Design and Interpretation of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies in Rodents: Approaches to Dose Selection *Crit Rev. Toxicol*. 37 (9): 729–837.
- 23) ILSI (International Life Sciences Institute) (1997). Principles for the Selection of Doses in Chronic Rodent Bioassays. Foran JA (Ed.). ILSI Press, Washington, DC.
- 24) Griffiths SA, Parkinson C, McAuslane JAN and Lumley CE (1994). The utility of the second rodent species in the carcinogenicity testing of pharmaceuticals. *The Toxicologist* 14(1):214.
- 25) Usui T, Griffiths SA and Lumley CE (1996). The utility of the mouse for the assessment of the carcinogenic potential of pharmaceuticals. In D'Arcy POF & Harron DWG (eds). Proceedings of the Third International Conference on Harmonisation. Queen's University Press, Belfast. pp 279–284.
- 26) Carmichael NG, Enzmann H, Pate I, Waechter F (1997). The Significance of Mouse Liver Tumor Formation for Carcinogenic Risk Assessment: Results and Conclusions from a Survey of Ten Years of Testing by the Agrochemical Industry. *Environ Health Perspect* 105:1196–1203.

▼ **M4**

- 27) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 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 DE, Wallace RB (1980). Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 40: 999–1003.
- 34) Gad SC (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health* 9: 691–704.
- 35) Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 108: 267–283.
- 36) Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind-limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.* 1: 233–236.
- 37) Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC (1991). Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.* 13: 599–609.
- 38) Weingand K, Brown G, Hall R *et al.* (1996). Harmonisation of Animal Clinical Pathology Testing in Toxicity and Safety Studies. *Fundam. & Appl. Toxicol.* 29: 198–201.
- 39) EMEA (draft) document „Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity” (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/a50115/2006).
- 40) Crissman JW, Goodman DG, Hildebrandt PK *et al.* (2004). Best Practices Guideline: Toxicological Histopathology. *Toxicologic Pathology* 32: 126–131.

▼ **M4**

1. liide

MÕISTE

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼B**B.34. ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONITOKSILISUSE UURING****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

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

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

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Puuduvad.

1.6. UURINGUMEETODI KIRJELDUS**1.6.1. Ettevalmistused**

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

▼B

1.6.2. Katseloomad

Liikide valik

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

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

Arv ja sugu

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

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

1.6.3. Katsetingimused

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

1.6.3.1. Annused

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

1.6.3.2. Piirsisalduskatse

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

▼B1.6.3.3. *Katse tegemine**Katse graafikud*

Uuritava aine igapäevast manustamist vanemate (P) põlvkonna isasloomadele tuleks alustada, kui nad on umbes viie kuni üheksa nädala vanused, pärast võõrutamist ja aklimatiseerimist vähemalt viie päeva vältel. Rottide puhul jätkatakse manustamist 10 nädala jooksul enne paaritamisperioodi (hiirte puhul 8 nädalat). Isasloomad tuleks hukata ja uurida pärast paaritusperioodi lõppu, või, teise võimalusena, võib isasloomi pidada katseratsioonil võimaliku teise pesakonna produtseerimiseni ning hukata ja uurida mingil ajaperioodil enne uuringu lõppu. Uuritava aine manustamine vanemate (P) põlvkonna emasloomadele peaks algama pärast vähemalt viie päeva pikkust aklimatisatsiooniperioodi ja vältama paaritamise eelselt vähemalt kaks nädalat. Uuritava aine igapäevane manustamine P emasloomadele peaks jätkuma kolmenädalase paaritumisperioodi, tiinuse ja imetamise vältel kuni F₁ järglaste võõrutamiseni. Annustamisskeemi modifitseerimist tuleks kaaluda juhtudel, kui uuritava aine kohta on lisaandmeid, näiteks aine metabolismi või bioakumulatsiooni puudutavat teavet.

Paaritusprotseduur

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

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

Katseloomi, kes ei paaritu, tuleks uurida eeldatava viljatuse põhjuste kindlaks tegemiseks.

See võib hõlmata selliseid protseduure, nagu lisavõimalused paaritumiseks teiste tõestatud viljakusega emas- või isasloomadega, suguorganite mikroskoopiline uurimine ja innatsükli või spermatogeneesi uurimine.

Pesakondade suurused

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

Kui kasutatakse standardiseerimist, on soovitatav rakendada allpool toodud protseduuri. 1. ja 4. poegimisjärgse päeva vahel võib iga pesakonna suurust korrigeerida, eemaldades valikuliselt liigsed pojad nii, et tulemuseks oleks võimalikult täpselt neli emast ja neli isast pesakonna kohta.

Kui emaste või isaste poegade arv ei võimalda koostada pesakonda neljast kummastki soost pojast, on sobiv ka osaline korrigeerimine (nt viis isast ja kolm emast). Korrigeerimine ei ole kohaldatav pesakondadele, kus on vähem kui kaheksa poega.

▼B

1.6.4. Jäl g i m i n e

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

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

Surnud ja 4. päeval hukatud pojad tuleks säilitada ja uurida võimalike defektide avastamiseks. Elusad pojad tuleks loendada ja pesakonnad kaaluda sünnijärgsel hommikul, 4. ja 7. päeval ja seejärel kord nädalas kuni uuringu lõpuni, mil loomi kaalutakse individuaalselt.

Emasloomal ja poegadel täheldatud käitumuslikud või füüsilised kõrvalekalded tuleb registreerida.

1.6.5. P a t o l o o g i a

1.6.5.1. L a h a n g

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

1.6.5.2. H i s t o p a t o l o o g i a

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

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

▼ B**2. ANDMED**

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

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

3. ARUANDLUS**KATSEARUANNE**

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmisi andmeid:

- kasutatud liik/liin;
- toksilise mõju andmed soo ja annuste kaupa, kaasa arvatud viljakuse, tiimuse ja elulemuse indeksid;
- surmaaeg uuringu ajal või kas loomad elasid kuni uuringu lõpetamiseni;
- tabelina esitatud iga pesakonna kaal, poja keskmine kehamass ja poegade individuaalsed kehamassid hukkamisel;
- toksilised või muud mõjud sigivusele, järglastele ja sünnijärgsele kasvule;
- iga kõrvalekalde täheldamise päev ja selle edasine areng;
- paaritamiseks valitud P loomade kehamassi andmed;
- lahanguleiud;
- kõigi mikroskoopiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- tulemuste statistiline töötlus, vajaduse korral;
- tulemuste arutelu;
- tulemuste tõlgendamine.

3.2. HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Vt B osa üldist sissejuhatust.

4. VIITED

Vt B osa üldist sissejuhatust.

▼B**B.35. KAHE PÕLVKONNA REPRODUKTSIOONI TOKSILISUSE UURING****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 416 (2001).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev kahe põlvkonna reproduktsiooni uurimise meetod on välja töötatud selleks, et pakkuda üldist teavet katseaine mõjude kohta isas- ja emasloomade reproduktiivsüsteemide rikkumatusele ja toimimisele, kaasa arvatud sugunäärmete funktsioonile, innatsüklile, paaritumiskäitumisele, viljastumisele, tiinusele, poegimisele, imetamisele ja võõrutamisele, ning teavet järglase kasvu ja arengu kohta. Uurimus võib pakkuda teavet ka katseaine mõjude kohta vastündinu haigestumisele, suremusele ning anda esialgseid andmeid sünnieelse ja sünnijärgse arengutoksilisuse kohta ja võib juhendada järgmiste katsete tegemist. Lisaks F_1 -põlvkonna kasvu ja arengu uurimisele on käesolev katsemeetod samuti mõeldud nii F_2 -põlvkonna isas- ja emasloomade reproduktiivsüsteemide rikkumatuse ja toimimise kui ka kasvu ja arengu hindamiseks. Arengutoksilisust ja funktsionaalseid puudujääke käsitleva täiendava teabe puhul saab käesolevasse protokollis lisada kas täiendavaid osauurimusi, vajadusel pidada nõu arengutoksilisust ja/või arenguga seotud neurotoksilisust käsitlevate meetodite üle või saab neid lõpp-punkte uurida eraldi uurimustes, kasutades sobivaid katsemeetodeid.

1.2. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Katseainet manustatakse gradueeritud annustena mitmetele isas- ja emasloomade rühmadele. P-põlvkonna isasloomadele tuleks annustada kasvu ajal ja vähemalt ühe täieliku spermatogeneesi tsükli jooksul (hiirtel ligikaudu 56 päeva ja rottidel 70 päeva), et tekitada spermatogeneesile kahjulikke mõjusid. Mõju spermale määratakse kindlaks mitmete spermaparameetrite (nt sperma morfoloogia ja liikuvus) ning koepreparaatide ja üksikasjalike histopatoloogiliste uurimuste abil. Kui spermatogeneesi käsitlevad andmed on olemas varasemast, korduvaid annuseid kasutavast uurimusest, mille kestus on piisav, nt 90päevane uurimus, ei ole vaja lisada hindamisse P-põlvkonna isasloomi. On siiski soovitatav, et P-põlvkonna spermaproove või digitaalseid salvestusi säilitatakse hilisema hindamise tarbeks. P-põlvkonna emasloomadele tuleks annustada katseainet kasvu ajal ja mitme täieliku innatsükli käigus, et tuvastada katseaine võimalikud kahjulikud mõjud tavapärasele innatsüklile. Katseainet manustatakse järglaste vanematele (P) nende paaritumise ajal, tiinuste ajal ja kuni F_1 -järglase võõrutamiseni. Võõrutamise ajal jätkatakse aine manustamist F_1 -järglastele ajal, mil nad arenevad täiskasvanuteks, paaritumise ajal ja F_2 -põlvkonna poegimise järel kuni võõrutamiseni.

Kliinilisi vaatlusi ja patoloogilisi uuringuid viiakse läbi kõikidel loomadel mürgisuse sümptomite tuvastamiseks, eriline tähelepanu on mõjudel isas- ja emasloomade reproduktiivsüsteemide rikkumatusele ja toimimisele ning järglase kasvule ja arengule.

▼B

1.3. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.3.1. Loomaliikide valik

Eelistatud loomaliik on rott. Kui kasutatakse muid liike, tuleks seda põhjendada ja asjaomased mugandused on vajalikud. Liine, kellel on madal sigivus või kellel teatakse olevat arenguhäireid, ei tohiks kasutada. Uuringut alustades peaks loomade massi muutus olema minimaalne ja ei tohiks ületada 20 % kummagi soo keskmisest massist.

1.3.2. Loomade pidamise ja toitmise tingimused

Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (\pm 3°). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt ei tohiks ületada 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal, siis eesmärgiks on hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Toitmisel võib kasutada tavapäraselt labori toiduvalikut koos piiramatul hulgal joogiveega. Toiduvalikut võib mõjutada vajadus tagada katseaine sobiv lisamine, kui katseainet manustatakse käesoleva meetodi abil.

Loomi võib hoida eraldi või väikestes, samast soost loomade rühmades. Paaritumine peab toimuma selleks ettenähtud puurides. Kui võib tõdeda, et suguuhe on toimunud, pannakse paaritunud emasloomad oma poegimis- või poegimispuuridesse. Paaritunud rotte võib samuti pidada väikestes rühmades ja eraldatakse üksteisest üheks või kaheks päevaks enne sünnitamist. Paaritunud loomadele antakse sünnituse lähenedes sobivad ja kindlaksmääratud pesapunumismaterjalid.

1.3.3. Loomade ettevalmistamine

Tuleks kasutada terveid täiskasvanud loomi, keda on harjutatud laboritingimustega vähemalt 5 päeva ja keda ei ole varem katsetes kasutatud. Katseloomade liik, liin, päritolu, sugu, kaal ja/või vanus on äratuntavad. Teadma peaks õe-venna suhteid loomade vahel, et vältida õdede-vendade paaritamist. Loomad määratakse juhuvaliku teel kontroll- ja katserühmadesse (kihistamine kehamassi järgi on soovitatav). Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Igale loomale tuleks anda ainulaadne tunnusnumber. P-põlvkonna puhul tuleks seda teha enne annustamise algust. F₁-põlvkonna puhul tuleks seda teha paaritumiseks valitud loomade võõrutamisel. F₁-sugupõlve kõikide valitud loomade puhul säilitatakse andmed pesakonna kohta, millest nad pärit on. Lisaks sellele soovitatakse identifitseerida pojad individuaalselt nii ruttu pärast sündi kui võimalik, kui poegi kaalutakse või tehakse muid funktsionaalseid katseid.

P-põlvkonna vanemad on ligikaudu 5–9 nädalat vanad annustamise alguses. Kõikide katserühmade loomad peaksid niipalju kui võimalik olema ühesuguse kaalu ja vanusega.

▼B

1.4. KATSE KÄIK

1.4.1. Loomade arv ja sugu

Igas katse- ja kontrollrühmas on piisav arv loomi, et katsesse saadakse eelistatult mitte vähem kui 20 tiinet emaslooma, kes on poegimas või hakkavad varsti poegima. Ainete puhul, mis põhjustavad käsitlemisega seotud soovimatuid mõjusid (nt steriilsus, liigne mürgisus suure annuse juures), ei ole see võimalik. Eesmärgiks on luua piisavalt tiinuse juhtumeid, et kindlustada sellise aine tähendusrikas hindamine, millel on võime mõjutada viljakust, tiinust ja ema käitumist ning imetamist, F_1 -järglase kasvu ja arengut viljastumisest kuni suguküpseks saamiseni ning nende järglaste (F_2) arengut kuni võõrutamiseni. Seetõttu, kui ei saada soovitud arvu tiineid loomi (s.t 20 looma), ei tähenda see, et katse on ilmtingimata invaliidne. Katse valiidsust hinnatakse iga üksikjuhtumi puhul eraldi.

1.4.2. Dooside valmistamine

On soovitav, et katseainet manustatakse suu kaudu (toidu ja joogivee kaudu või sondi abil), välja arvatud juhul, kui muud manustamisviisi (nt naha kaudu või sissehingamine) peetakse sobivamaks.

Vajadusel lahustatakse või suspendeeritakse katseaine sobivas kandeaines. On soovitav, et võimaluse korral kaalutakse esmalt vesilahuse-/suspensiooni kasutamist, seejärel õlilahuse-/emulsiooni (nt maisiõli) kasutamist ja siis võimalikku muude kandealuste lahust. Veest erinevate kandeainete puhul peaks kandeaine toksikoloogilised omadused teada olema. Katseaine stabiilsus kandeaines määratakse kindlaks.

1.4.3. Annustamine

Tuleks kasutada vähemalt kolme annusemäära ja samaaegset kontrolli. Kui katseaine füüsikalise-keemilise laadi või bioloogilised mõjud ei sea piiranguid, valitakse suurim annusemäär selliselt, et põhjustab mürgisust, kuid ei põhjusta surma ega raskeid kannatusi. Ootamatu suuremuse korral on tavaliselt siiski aktsepteeritavad sellised uuringud, milles P-sugupõlve vanemate suuremuse on ligikaudu alla 10 %. Tuleks valida annusemäärade alanev järjestus, et näidata annusega seotud reaktsiooni ja täheldamata kahjuliku mõju taset (NOAEL). Kahe- või neljakordsed vahemikud on sageli optimaalsed alanevate annusemäärade kehtestamisel ja sageli on eelistatud neljanda katserühma lisamine väga suurte vahemike (nt üle kümnekordne tegur) annuste vahel. Toitumisuuringute puhul ei tohiks annuste vahemik olla mitte suurem kui kolmekordne. Annusemäärade tuleks valida varasemaid mürgisust käsitlevaid andmeid, eriti annuseid käsitlevate kordusuuringute tulemusi arvesse võttes. Mis tahes kättesaadavat teavet metabolismi ja katseühendi või sellega seotud ainete kineetika kohta tuleks samuti arvesse võtta. Selline teave aitab samuti viidata sellele, et annustamisrežiim on adekvaatne.

▼B

Kontrollrühmaks on rühm, kellega katseid ei tehta, või kandeainet saav kontrollrühm, kui kandeainet kasutatakse katseaine manustamisel. Kontrollrühma loomi käsitletakse sarnaselt katserühma loomadega, kuid neile ei anta uuritavat ainet. Kui kasutatakse kandeainet, saab kontrollrühm kandeainet suuremas mahus. Kui katseainet manustatakse toidu kaudu ja seetõttu väheneb toidu võtmine või ärakasutamine, siis võib pidada vajalikuks paariskontrollrühma kasutamist. Teise võimalusena võib kasutada samaaegsete paariskontrollrühmade asemel andmeid, mis on saadud sellistest kontrollitud uuringutest, mis on välja töötatud selliste mõjude hindamiseks, mille on vähenenud toidutarbimine põhjustanud reproduktiivsetele parameetritele.

Arvesse võetakse kandeaine ja muude lisandite järgmiseid omadusi: katseaine absorptsiooni, jaotamist, metabolismi või peetumist käsitlevad mõjud; katseaine keemilisi omadusi käsitlevad mõjud, mis võivad muuta toksilisi omadusi; ning toidu- või veetarbimist või toitumust käsitlevad mõjud.

1.4.4. Piirisalduskatse

Kui suukaudne uuring ühe annusemääraga, mis on vähemalt 1 000 mg/kg kehamassi kohta päevas või vastav protsendimäär toidus või joogivees, kui manustatakse toidu või joogivee kaudu, kasutades käesolevas uuringus kirjeldatud protseduure, ei tekita täheldatavaid toksilisi mõjusid vanematele või nende järglastele ja kui mürgisus eeldatavasti ei põhine struktuurselt ja/või metaboolselt sarnaste ühendite kohta käival andmetel, siis ei peeta vajalikuks täieliku uuringu tegemist, kus kasutatakse mitmeid annusemäärasid. Piirisalduskatset kohaldatakse, välja arvatud siis, kui inimese kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat suukaudset annusemäära. Muude manustamisviiside korral, nagu näiteks sissehingamine või naha kaudu manustamine, võivad katseaine füüsikalised-keemilised omadused nagu lahustuvus tihti viidata suurimale kokkupuutetasemele ja seada sellele piiranguid.

1.4.5. Annuste manustamine

Loomadele annustatakse katseainet 7 päeva nädalas. Eelistatakse suukaudset manustamist (toit, joogivesi või sond). Kui kasutatakse muud manustamisviisi, tuleks seda põhjendada ning asjaomased muudatused võivad osutuda vajalikuks. Kõikidele loomadele annustatakse ainet sama meetodi järgi asjaomase katseperioodi jooksul. Kui katseainet manustatakse sondi abil, tehakse seda läbi söögitoru. Korraga manustatava vedeliku maht ei ületa 1 ml/100 g kehamassi kohta (0,4 ml/100 g kehamassi kohta on maksimum maisiõli puhul), välja arvatud vesilahuste puhul, kui võib kasutada 2 ml/100 g kehmassi kohta. Välja arvatud ärritavad või söövitavad ained, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katses kasutatavate mahtude varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks. Sundsöötmisega seotud uuringutes saavad pojad tavaliselt katseainet üksnes kaudselt piimast, vahetu annustamine algab nende jaoks võõrutuse ajal. Toidu või joogiveega seotud uuringutes saavad pojad täiendavalt katseainet vahetult, kui nad hakkavad ise sööma imetamisperioodi viimasel nädalal.

▼B

Toidu või joogivee kaudu manustatud ainete puhul on oluline tagada, et hõlmatud katseaine kogused ei häiriks tavapärasest toimumist või veetasakaalu. Kui katseainet manustatakse toidus kas püsiva toidukontsentratsioonina (ppm) või võidakse kasutada püsivat annusemäära looma kehamassi suhtes, siis tuleb täpsustada kasutatud alternatiivi. Sondi kaudu manustatud aine puhul tuleks annus anda samal kellaajal iga päev ja kohandada vähemalt igal nädalal, et säilitada konstantset annusemäära looma kehamassi suhtes. Sondiannuse kohandamisel kaalu järgi tuleks arvesse võtta teavet katseaine platsenta kaudu levimise kohta.

1.4.6. **Katsete ajakava**

P-põlvkonna isas- ja emasloomade puhul algab igapäevane annustamine siis, kui nad on 5–9 nädalat vanad. F₁-isas- ja emasloomade puhul algab igapäevane annustamine võõrutamise ajal, tuleb meeles pidada, et katseaine toidu või joogivee kaudu manustamise korral võib toimuda F₁-põlvkonna poegade vahetu kokkupuude katseainega juba imetamise ajal. Mõlema soo puhul (P ja F₁) jätkatakse annustamist vähemalt 10 nädalat enne paaritamist. Annustamist jätkatakse mõlemast soost loomade puhul kahe nädalase paaritumisperioodi jooksul. Isasloomad surmatakse humaanselt ja uuritakse neid siis, kui neid ei ole enam vaja reproduktiivsuse mõjude hindamiseks. P-põlvkonna emasloomade puhul jätkatakse annustamist kogu tiinuse aja ja kuni F₁-järglaste võõrutamiseni. Arvesse tuleks võtta muudatusi annustamise ajakavas, mis põhinevad katseaine, sh varasematel mürgisuse, metabolismi või bioakumulatsiooni tekke kohta käivatel kättesaadavatel andmetel. Iga looma annus peab tavaliselt põhinema looma kõige viimase individuaalse kehamassi kindlaksmääramisel. Annuse määramisel tuleks siiski olla ettevaatlik tiinuse viimasel trimestril.

P- ja F₁-põlvkonna isas- ja emasloomade käsitlemist jätkatakse kuni surmamiseni. Kõik P- ja F₁-põlvkonna täiskasvanud isas- ja emasloomad surmatakse humaanselt, kui neid enam ei vajada reproduktiivsuse mõjude hindamiseks. F₁-järglased, keda ei ole valitud paaritumiseks, ning kõik F₂-järglased surmatakse humaanselt pärast võõrutamist.

1.4.7. **Paaritumisprotseduur**

1.4.7.1. *P-põlvkonna paaritumine*

Iga paaritumise korral pannakse emasloom ühte puuri ühe sama annusemääraga isasloomaga (1:1 paaritumine) kuni suguühete toimimiseni või kaheks nädalaks. Iga päev uuritakse emasloomadel sperma või tupekorgi olemasolu. Tiinuse 0. päevaks peetakse päeva, mil leitakse tupekork või sperma. Kui paaritumine ei õnnestunud, saab kaaluda emaslooma uuesti paaritamist sama rühma viljakaks peetava isasloomaga. Paarituvad paarid tuleks selgesti andmetes ära näidata. Ödede-vendade paaritumist tuleks vältida.

▼B1.4.7.2. *F₁-põlvkonna paaritumine*

F₁-järglaste paaritumise korral valitakse vähemalt üks isasloom ja üks emasloom võõrutamise ajal igast pesakonnast paaritumiseks muude sama annusemääraga, kuid erinevast pesakonnast poegadega, et sünniks F₂-põlvkond. Poegade valimine igast pesakonnast peaks olema juhuslik, kui poegade kehamassis või välimuses olulisi erinevusi ei ole täheldatud. Juhul kui on täheldatud nimetatud erinevusi, valitakse iga pesakonna parimad esindajad. Pragmaatilisel on seda kõige parem teha kehamassi põhjal, kuid seda võib teha ka välimuse põhjal. F₁-järglasi ei paaritata enne, kuni nad on saanud täiesti suguküpseks.

Poegimata paare tuleks hinnata, et kindlaks määrata viljatuse näiv põhjus. See võib hõlmata selliseid protseduure nagu lisavõimalused paaritumiseks muude viljakaks peetavate isade või emadega, suguelundite mikroskoopiline uurimine ning innatsükli või spermatogeneesi uurimine.

1.4.7.3. *Teine paaritumine*

Teatavatel juhtudel, nagu käsitlemisega seotud muutused pesakonna suuruses või ebaselge mõju täheldamine esimesel paaritumisel, on soovitatav, et P- või F₁-sugupõlve täiskasvanud loomad paarituksid uuesti teise pesakonna saamiseks. On soovitatav uuesti paaritada emas- ja isasloomi, kellel ei ole varem pesakonda olnud, viljakaks peetavate erinevast soost loomadega. Kui teise pesakonna saamist peetakse mõlemas põlvkonnas vajalikuks, tuleks loomad uuesti paaritada ligikaudu nädal pärast eelmise pesakonna võõrutamist.

1.4.7.4. *Pesakonna suurus*

Loomadel lubatakse poegida tavaliselt ja kasvatada järglased üles kuni võõrutamiseni. Pesakonna suuruse ühtlustamine ei ole kohustuslik. Kui seda on ühtlustatud, tuleks üksikasjalikult kirjeldada kasutatud meetodit.

1.5. VAATLUSED

1.5.1. **Kliinilised vaatlused**

Iga päev tuleks teha üldine kliiniline vaatlus ja sondi kaudu annustamise korral peaks selle ajastamisel arvesse võtma mõjude oodatavat kõrghetke pärast annustamist. Käitumise muutused, raske või pikaleveninud poegimise märgid ja kõik mürgisuse tunnused tuleks registreerida. Üksikasjalikum lisauuring iga looma kohta tuleks teostada vähemalt iga nädal ja kõige parem oleks seda teha siis, kui looma kaalutakse. Kõiki loomi tuleks jälgida haigestumise ja suremuse osas kaks korda päevas ja vajadusel nädalavahetusel kord päevas.

▼ B**1.5.2. Poeginud loomade kehamass ja toidu/vee tarbimine**

P- ja F₁-põlvkonna poeginud loomi kaalutakse annustamise esimesel päeval ja seejärel vähemalt kord nädalas. Poeginud emasloomi (P- ja F₁-põlvkond) kaalutakse vähemalt tiinuse 0-, 7., 14. ja 20. või 21. päeval ning imetamise ajal samadel päevadel poegade kaalumisel ja loomade surmamispäeval. Nimetatud vaatlustest tuleks teatada üksikhaaval iga täiskasvanud looma kohta. Paaritumisele eelneval ajal ja tiinusperioodil mõõdetakse toidu tarbimist vähemalt iga nädal. Vee tarbimist mõõdetakse vähemalt iga nädal, kui katseainet manustatakse vees.

1.5.3. Innatsükkel

Innatsükli pikkuse ja normaalsust hinnatakse P- ja F₁-põlvkonna emasloomadel tupeäiete abil enne paaritumist ja valikuliselt paaritumise ajal, kuni leitakse tõendeid paaritumise toimumise kohta. Tupe-/emakakaelarakke võttes tuleks olla ettevaatlik, et vältida limaskestast kahjustamist ja seejärel pseudotiinuse teket (1).

1.5.4. Spermaparameetrid

Kõikide P- ja F₁-põlvkonna isasloomade surmamisel registreeritakse munandite ja munandimanuse mass ning üks kummastki elundist säilitatakse histopatoloogiliseks uurimiseks (vt punkte 1.5.7, 1.5.8.1). P- ja F₁-põlvkonna igast rühmast eraldatakse vähemalt kümne isaslooma suurune osarühm, allesjäänud munanditest ja munandimanustest loendatakse homogeenimisele resistentsed spermatiidid ja munandimanuse sabas säilinud sperma hulk. Sama osarühma isasloomade puhul tuleks koguda munandimanuse sabas või seemnejuhas olev sperma liikuvuse ja sperma morfoloogia hindamiseks. Kui täheldatakse käsitlemisega seotud mõjusid või kui on tõendeid muude uuringute võimalike mõjude kohta spermatogeneesi, tuleks hinnata iga annusrühma kõikide isasloomade spermat; vastasel juhul võib loendamine piirduda kontrollrühma ning suure annusega rühma P- ja F₁-põlvkonna isasloomadega.

Homogeenimisele resistentsete munandites olevate spermatiidide ja munandimanuse sabas oleva sperma koguhulk tuleks arvutada (2, 3). Munandimanuse sabas säilinud seemnerakkude arv võib lähtuda kvaliteetivseteks hindamiseks kasutatud suspensioonis olevate seemnerakkude kontsentratsioonist ja mahust ning järelejäänud munandimanuse sabakoe jahvatamisel ja/või homogeenimisel saadud seemnerakkude arvust. Arvutamised tuleks teha kõikide valitud isasloomade osarühmade kõikides annuserühmades pärast loomade surmamist, välja arvatud juhul, kui tehakse video- või digitaalsalvestusi või kui proovid külmutatakse ja analüüsitakse hiljem. Sellistel juhtudel võib esmalt analüüsida kontrollrühma ja suure annusega rühma. Kui käsitlemisega ei kaasne mõjusid (nt mõjud seemnerakkude arvule, sperma liikuvusele ja morfoloogiale), ei ole vaja analüüsida muid annuserühmasid. Kui on täheldatud käsitlemisega kaasnevaid mõjusid, siis tuleks samuti hinnata väiksema annusega rühmasid.

▼B

Munandimanuse (või seemnejuha) sperma liikuvust tuleks hinnata või videosalvestada kohe pärast surmamist. Sperma tuleks koguda, minimiseerides kahju, ning lahjendada liikuvusanalüüsi jaoks vastuvõetavaid meetodeid kasutades (4). Progressiivselt liikuva sperma protsendimäär tuleks kindlaks määrata kas subjektiivselt või objektiivselt. Kui arvutipõhine liikuvusanalüüs sooritatakse (5, 6, 7, 8, 9, 10), sõltub progressiivne liikumine kasutaja määratud keskmise liikumiskiiruse ja otsesuse künnisest või lineaarsest indeksist. Kui proove filmitakse (11) või kujundid salvestatakse muul moel lahangu ajal, võib jätkuanalüüsi teha üksnes kontrollrühma ja suure annusega rühma P- ja F₁-põlvkonna isasloomadega, välja arvatud juhul, kui täheldatakse käsitlemisega kaasnevaid mõjusid; sellisel juhul tuleks samuti hinnata väikese annusega rühmasid. Video- või digitaalpildi puudumisel tuleks analüüsida kõikide katserühmade kõiki proove lahangu ajal.

Munandimanuse (või seemnejuhade) spermaproovi tuleks morfoloogiliselt hinnata. Spermat (vähemalt 200 seemnerakku proovi kohta) tuleks uurida fiksiiviga käsitatud märgpreparaatidena (12) ja liigitada kas tavaliseks või ebatavaliseks. Morfoloogiliste sperma kõrvalekallete näidete hulka kuuluvad kokkusulamine, isoleeritud pead ning peade ja/või sabade ebamoodustised. Hinnata tuleks kõikidest annuserühmadest valitud isasloomade osarühma kas vahetult pärast loomade surmamist või video- ja digitaalsete salvestuste põhjal hiljem. Ägeid, mis on juba fikseeritud, võib uurida hiljem. Sellistel juhtudel võib esmalt analüüsida kontrollrühma ja suure annusega rühma. Kui käsitlemisega ei kaasne mõjusid (nt mõjud sperma morfoloogiale), ei ole vaja analüüsida muid annuserühmasid. Kui on täheldatud käsitlemisega kaasnevaid mõjusid, siis tuleks samuti hinnata väiksema annusega rühmasid.

Kui mõnda eespool nimetatud sperma hindamisparameetritest on juba uuritud süsteemse toksilisuse uuringu osana vähemalt 90 päeva, ei ole neid vaja tingimata korrata kahe põlvkonna uuringus. On siiski soovitatav, et P-põlvkonna spermaproovid või digitaalsed salvestused säilitatakse hilisema hindamise tarbeks.

1.5.5. Järglane

Iga pesakonda uuritakse nii ruttu kui võimalik pärast poegimist (imetamise 0-päev), et kindlaks määrata poegade arv ja sugu, surnult sündid, elussünnid ja kõikide anomaaliade olemasolu. 0-päeval surnult leitud poegi (kui nende laibad on leotamata) tuleks soovitatavalt uurida võimalike defektide ja surmapõhjuse osas ning laibad tuleks säilitada. Elusad pojad tuleks kokku lugeda ja üksikhaaval kaaluda sünni hetkel (imetamise 0-päev) või 1. päeval, ning seejärel regulaarsetel kaalumispäevadel, nt imetamise 4., 7., 14. ja 21. päeval. Füüsilised või käitumuslikud kõrvalekalded, mida on täheldatud emadel või järglastel, tuleks registreerida.

▼B

Järglase füüsiline areng tuleks registreerida peamiselt kehamassi lisandumise teel. Muud füüsilised parameetrid (nt kõrva ja silma avanemine, hammaste teke, karvakasv) võivad anda täiendavat teavet, kuid nimetatud andmeid peaks soovitatavalt hindama seksuaalset küpsust käsitlevate andmete kontekstis (nt vanus ja kehamass tupe avanemisel või suguti ja eesnaha eraldumisel) (13). Soovitatakse F_1 -põlvkonna järglaste funktsionaalseid uuringuid (nt motoorne tegevus, sensoorne funktsioon, reflekside ontogenees) enne ja/või pärast võõrutamist, eelkõige neid uuringuid, mis on seotud seksuaalse küpsusega, juhul kui selliseid uuringuid ei käsitleta eraldi katsetes. Tupe avanemise ja eesnaha eraldumise iga määratakse kindlaks paaritumiseks valitud F_1 -põlvkonna võõrutatud poegade puhul. Anogenitaalset vahemaad mõõdetakse sünnijärgsel 0. päeval F_2 -põlvkonna poegade puhul, kui F_1 -põlvkonna sooline jagunemine või seksuaalse küpsuse saavutamise ajastus selleks põhjust annavad.

Funktsionaalsed vaatlused võib ära jätta rühmades, millel vastasel juhul ilmneksid negatiivsete mõjude selged tunnused (nt oluline massi vähenemine jne). Kui funktsionaalseid uuringuid tehakse, ei peaks neid tegema paaritumiseks valitud poegadega.

1.5.6. Üldlahang

Surmamise või uuringu käigus suremise korral uuritakse makroskoopiliselt kõiki poeginud loomi (P- ja F_1 -põlvkond), kõiki väliste kõrvalekalletega või kliiniliste tunnustega poegi ja juhuslikult valitud F_1 - ja F_2 -põlvkonna mõlemast soost ja igast pesakonnast poegi mis tahes struktuuriliste kõrvalekallete või patoloogiliste muutuste suhtes. Eristatava tähtsusega tuleks pöörata reproduktiivsüsteemi elunditele. Tuleks uurida humaanselt surmatud suremissesundis poegade või surnud poegade (kui nende laibad on leotamata) võimalikke defekte ja/või surmapõhjust ning nende laibad tuleks säilitada.

Kõikide esimest korda poegivate emasloomade emakat tuleks uurida implantatsioonikohtade olemasolu ja arvu suhtes viisil, mis ei sisalda histopatoloogilist hindamist.

1.5.7. Elundite massid

Surmamise ajal määratakse kindlaks kõikide P- ja F_1 -põlvkonna poeginud loomade kehamass ja järgmiste elundite mass (paariselundid peaks kaaluma ükshaaval):

- emakas, munasarjad;
- munandid, munandimanused (kogumass ja sabaosa mass);
- eesnääre;
- seemnepõiekesed koos näärmete ja nendes olevate vedelikega ning eesnäärmega (tervikuna);
- aju, maks, neerud, põrn, ajuripats, kilpnäärmed ja neerupealsed ning määratud sihtelundid.

Lahanguks valitud F_1 – ja F_2 -põlvkonna poegade kehamassid tuleks määrata kindlaks surmamisel. Kaalutakse järgmiseid elundeid, mis on juhuslikult valitud ühest pojast/soost/pesakonnast (vt punkt 1.5.6): aju, põrn ja harknääre.

▼B

Üldlahangu ja elundite kaalumise tulemusi tuleks hinnata muudes, korduvate annustega uuringutes tehtud vaatluste kontekstis, kui see on teostatav.

1.5.8. **Histopatoloogia**1.5.8.1. *Poeginud loomad*

P- ja F₁-põlvkonna poeginud loomadelt eemaldatakse järgmised elundid ja koed või nende representatiivsed proovid ja neid säilitatakse sobivas kasvukeskkonnas histopatoloogilise uuringu tarbeks:

- tupp, emakas koos emakakaelaga ning munasarjad (säilitatakse sobivas kinnitis);
- üks munand (säilitatakse Bouini või võrreldavas kinnitis), üks munandimanus, seemnepõiekesed, eesnääre ja selle eesosa;
- eelnevalt identifitseeritud sihtelund(id) kõikidelt paaritumiseks valitud P- ja F₁-põlvkonna loomadelt.

Eespool loetletud säilitatud elundite ja kudede täielik histopatoloogiline uuring tehakse kõikide paaritumiseks valitud ning suure annusega ja kontrollrühma kuuluvate P-ja F₁-põlvkonna loomade kohta. P-põlvkonna loomade munasarjade uurimine ei ole kohustuslik. Käsitlemisega seotud muutustega elundeid tuleks samuti uurida väikese ja keskmise annusega rühmades, et aidata NOAELi välja selgitada. Lisaks sellele tuleks selliste väikese ja keskmise annusega loomade, kellel kahtlustatakse vähenenud viljakust, nt need, kellel ei õnnestunud paarituda, viljastuda, sigitada või sünnitada terveid järglasi, või need, kelle innatsükli või sperma hulka, liikuvust või morfoloogiat mõjutati, suguelundeid hinnata histopatoloogiliselt. Kõiki üldkahjustusi, nagu atroofia või kasvajak, tuleks uurida.

Munandeid tuleks üksikasjalikult histopatoloogiliselt uurida (nt kasutades Bouini kinnitit, parafiinilõike või 4–5 µm paksuseid läbilõikeid), et kindlaks teha käsitlemisega seotud mõjud nagu paigale jäänud spermatiidid, puuduvad sugurakukihid või -liigid, hulktuumsed hiidrakud või spermatogeensete rakkude irdumine luumehisse (14). Puutumatu munandimanuse puhul tuleb uurida pead, keha ja saba, mida saab teha pikilõigete hindamise teel. Munandimanuse puhul tuleks hinnata leukotsüüdi infiltratsiooni, rakutüüpide esinemissageduse muutusi, hälbivaid rakutüüpe ja sperma fagotsütoosi. PAS- ja hematoksyliiniga värvimist võib kasutada isasloomade suguelundite uurimisel.

Imetamisjärgne munasari peaks sisaldama alg- ja kasvavaid munarakke ning imetamisaegseid suuri kollakehasid. Histopatoloogiline uurimine peaks tuvastama algmunarakkude populatsiooni kvalitatiivse vähenemise. Algmunarakkude kvantitatiivne hindamine tuleks teha F₁-põlvkonna emasloomadele; loomade arv, munasarjalõigete valik ja lõikeproovi suurus peaksid statistiliselt sobima kasutatava hindamisprotseduuriga. Uurimisel peaks arvutama algmunarakkude arvu, mida saab kombineerida väikeste kasvavate munarakkudega, katse- ja kontrollrühma kuuluvate munasarjade võrdlemiseks (15, 16, 17, 18, 19).

▼B1.5.8.2. *Võõrutatud pojad*

Kõikide väliste kõrvalekalletega või kliiniliste tunnustega poegade, samuti paaritumiseks mittevalitud F₁- ja F₂-põlvkonnast juhuslikult valitud ühe poja/soo/pesakonna selgete kõrvalekalletega kude ja sihtelundid fikseeritakse ja säilitatakse sobivas kasvukeskkonnas histopatoloogilise uurimise tarbeks. Säilitatud kudedele tehakse täielik histopatoloogiline määramine, milles peardõhk on reproduktiiv-süsteemi elunditel.

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Andmed edastatakse kokkuvõtlikult iga emaslooma ja nende järglase kohta tabeli kujul, näidates iga katserühma ja põlvkonna kohta loomade arvu katse alguses, katse käigus surnud või humaansetel kaalutlustel surmatud loomade arvu, surma ja humaanse surmamise ajad, viljakate emasloomade arvu, tiinete emasloomade arvu, mürgistusnähtudega loomade arvu, mürgistusnähtude kirjelduse, sh toksiliste mõjude algusaja, kestuse ja raskuse, embrüot/loodet käsitlevate vaatluste liigid ja kogu asjaomane teave pesakonna kohta.

Numbrilisi tulemusi tuleks hinnata sobiva, üldiselt heakskiidetud statistilise meetodi abil; statistilised meetodid tuleks valida uurimuse kavandamisel ja neid tuleks põhjendada. Annuse ja sellele reageerimise statistilised mudelid võivad olla andmete analüüsimisel vajalikud. Protokoll peaks hõlmama piisavalt teavet analüüsimetodi kohta ja kasutatava arvutiprogrammi kohta, nii et sõltumatu arvestaja/statistik võib uuesti hinnata ja rekonstrueerida analüüsi.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE

Kahe põlvkonna reproduktsiooni toksilisuse uuringu avastusi tuleks hinnata täheldatud mõjude, kaasa arvatud lahangu- ja mikroskoopilised leiud, suhtes. Hindamine hõlmab katseaine annuse ja kõrvalekallete – sh üldkahjustused, identifitseeritud sihtelundid, mõjutatud viljakus, kliinilised kõrvalekalded, mõjutatud paljunemisvõime ja pesakonna suurus/laad, kehamassi muutused, mõjud suremusele ja mis tahes muud toksilised mõjud – olemasolu või puudumise, esinemissageduse ja raskusastme vahelist seost või selle puudumist. Katseaine füüsikalise-keemilise omadusi ja vajaduse korral toksikoki-neetilisi andmeid tuleks võtta arvesse katsetulemuste hindamisel.

Nõuetekohaselt tehtud reproduktsiooni toksilisuse uuring hindab rahuldavalt mõjuta määrasid ja mõistab reproduktsioonile, poegimisele, imetamisele, sünnijärgsele arengule, kaasa arvatud kasv ja seksuaalne areng, kahjulikke mõjusid.

▼B

2.3. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Kahe põlvkonna reproduktsiooni toksilisuse uuring annab teavet korduvate ainega kokkupuudete mõjude kohta reproduktiivtsükli kõikidel etappidel. Eelkõige annab uuring teavet reproduktiivparameetrite kohta ning järglaste arengu, kasvu, suguküpseks saamise ja ellujäämise kohta. Uuringu tulemusi tõlgendatakse koostoimes subkroonilisel, sünnieelse arengu ja toksikokineetilisel ning muudel uuringutel tehtud avastustega. Käesoleva uuringu tulemusi võib kasutada kemikaali täiendava uurimise vajaduse hindamisel. Uuringu tulemuste ekstrapoleerimine on kehtiv piiratud ulatuses. Neid saab kõige paremini kasutada teabe andmiseks mõjuta määrade ja inimeste lubatud kokkupuudete kohta (20, 21, 22, 23).

3. **PROTOKOLL**

3.1. KATSEPROTOKOLL

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Katseaine:

- füüsiline laad ja vajaduse korral füüsikalised-keemilised omadused;
- tunnusandmed;
- puhtus.

Kandeaine (vajaduse korral):

- kandeaine valiku põhjendus, kui see on veest erinev.

Katseloomad:

- kasutatud liigid/tüved;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, toitumine, pesamaterjalid jne;
- iga looma kaal katse alguses.

Katsetingimused:

- annuste valiku põhjendus;
- katseaine valmistise/toidupreparaadi üksikasjad, saadud kontsentratsioonid;
- preparaadi stabiilsus ja homogeensus;
- katseaine manustamise üksikasjad;
- toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) muutmine tegelikuks annuseks (mg kg kehamassi kohta päevas), vajaduse korral;
- üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta.

▼B

Tulemused:

- toidu tarbimine ja vajaduse korral vee tarbimine, toidu tõhusus (kehamassi lisandumine tarbitud toidu grammi kohta) ning katseaine tarbimine P- ja F₁-põlvkonna loomadel, välja arvatud perioodil, mil loomi hoitakse koos, ja vähemalt imetamise viimasel kolmandikul;
- andmed absorptsiooni kohta (kui seda on mõõdetud);
- paaritumiseks valitud P- ja F₁-põlvkonna loomade kehamassi andmed;
- pesakonna ja poegade massi andmed;
- andmed poeginud loomade kehamassi kohta surmamisel ning elundite täieliku ja suhtelise massi kohta;
- kliiniliste vaatluste laad, raskus ja kestus (sõltuvalt sellest, kas kahjud on pöörduvad või mitte);
- surmaaeg katse ajal või andmed loomade ellujäämise kohta kuni surmamiseni;
- andmed toksilise reaktsiooni kohta sooti ja annuste kaupa, kaasa arvatud paaritumis-, viljakus-, tiinus-, sünni-, elujõulisus- ja imetamisindeksid; protokoll peaks viitama nende indeksite arvutamisel kasutatud arvudele;
- toksilised või muud mõjud reproduktioonile, järglastele, sünnijärgsele kasvule jne;
- lahangu leiud;
- kõikide histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- tavalise innatsükliga P- ja F₁-põlvkonna emasloomade arv ning tsükli pikkus;
- munandimanuse sabaosas oleva sperma koguarv, progressiivselt liikuva sperma protsendimäär, morfoloogiliselt normaalse sperma protsendimäär ning tuvastatud kõrvalekaldega sperma protsendimäär;
- aega paaritumiseni, sh päevade arv paaritumiseni;
- tiinuse pikkus;
- implantatsioonide arv, kollakehad, pesakonna suurus;
- elussündide arv ja implantatsioonide järel toimunud abordid;
- selgelt nähtavate arenguhälvetega poegade arv, kui see on kindlaks määratud, tuleks teatada kängujäänud loomade arv;
- andmed poegade füüsilise arengu järkude kohta ja andmed muude sünnijärgsete arengute kohta; hinnatud füüsilise arengu järke tuleks põhjendada;
- andmed poegade ja täiskasvanud loomade funktsionaalsete vaatluste kohta;
- vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine.

▼B

Tulemuste arutelu.

Järeldused, sh NOAEL-väärtused mõjude kohta emadele ja järglastele.

4. VIITED

- 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 Dimethanesulfonate 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 Spermatotoxicity 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. (19 91). Toxic Responses of the Reproductive System. In: *Casarett and Doull's Toxicology*, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. 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) (23) Palmer, A.K. (19 78). In *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

▼ **M4****B.36. TOKSIKOKINEETIKA****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 417 (2010). Uuritava kemikaali toksikokineetika uuringud tehakse selleks, et saada tõest teavet kemikaali imendumise, jaotumise, biotransformatsiooni (metaboliseerimise) ja väljutamise kohta, et aidata kaasa kontsentratsiooni või doosi seostamisele täheldatud mürgisusega ning aidata mõista selle mürgisuse mehhanismi. Toksikokineetika võib aidata mõista toksikoloogiuuringuid, kuna sel viisil näidatakse, et katseloomad puutuvad uuritava kemikaaliga kokku süsteemselt, ning selgitatakse välja, millised struktuuriühikud (lähtekemikaal/metaboliidid) ringlevad katselooma organismis. Kõnealustest uuringutest saadavad toksikokineetika põhiparameetrid annavad teavet ka uuritava kemikaali võimaliku akumulatsiooni kohta kudedesse ja/või organismesse ning uuritava kemikaaliga kokkupuute tõttu võimaliku biotransformatsiooni põhjustamise kohta.
2. Toksikokineetika andmed võivad aidata hinnata, kui võrd adekvaatne ja asjakohane on ekstrapoleerida loomadel avalduva mürgisuse andmeid inimestega seotud ohtude ja/või riskide hindamisele. Lisaks sellele võivad toksiko-kineetilised uuringud anda kasulikku teavet mürgisuse uuringute doositasemetel (lineaarne vs. mittelineaarne kineetika), manustamistee mõju ja biokättesaadavuse kindlakstegemiseks ning uuringu kavandamise küsimuste lahendamiseks. Teatavat tüüpi toksikokineetika andmeid on võimalik kasutada füsioloogial põhineva toksikokineetika (PBTK) mudeli arendamiseks.
3. Metaboliitide/toksikokineetika andmetel on tähtsaid kasutusvaldkondi, näiteks aitavad need ennustada kemikaalide võimalikku mürgisust ja toimeviisi ning mõista mürgisuse ja toimeviisi seoseid doositaseme ja kokkupuutumisteedega. Lisaks sellele võib kemikaalide metaboliseerumise andmetest saada teavet, mis aitab hinnata uuritava kemikaali eksogeenselt tekkinud/valmistatud metaboliitidega kokkupuute toksikoloogilist tähtsust.
4. Head toksiko-kineetilised andmed aitavad teha järeldusi, kui võrd usaldusväärsed ja kasutatavad on kemikaalide ohutuse hindamisel kvantitatiivsed struktuuri-aktiivsuse sõltuvused, analoogmeetodid ja grupeerimismeetodid. Kineetika andmeid võib kasutada ka muude uuringute (näiteks *in vivo* / *in vitro*) toksikoloogilise asjakohasuse hindamiseks.
5. Kui ei ole nimetatud muud manustamisteed (vt eelkõige punktid 74–78), kasutatakse käesolevat katsemeetodit uuritava kemikaali suukaudse manustamise puhul.

LÄHTEKAALUTLUSED

6. Õigussüsteemides on eri kemikaalide klasside (näiteks pestitsiidid, biotsiidid, tööstuskemikaalid) toksikokineetika näitajate ja parameetrite mõõtmisega seoses sätestatud erinevad nõuded ja vajadused. Erinevalt enamikust katsemeetodidest kirjeldatakse käesolevas katsemeetodis toksikokineetika katseid, mis hõlmavad mitmeid mõõtmisi ja näitajaid. Tulevikus töötatakse arvata-vasti välja mitu uut katsemeetodit ja/või juhenddokumenti, et kirjeldada eraldi ja täpsemalt iga näitajat. Käesoleva katsemeetodi puhul määratakse tehtavad katsed või hindamised kindlaks iga õigussüsteemi nõuete ja/või vajadustega.

▼ **M4**

7. Regulatiivseks otstarbeks võib uuritava kemikaali toksiko-kineetilist käitumist hinnata paljude uuringutega. Kõik kõnealused võimalikud uuringud ei pruugi uuritava kemikaali hindamiseks olla siiski vajalikud, kõik oleneb konkreetsetest regulatiivsetest vajadustest või olukorrast. Toksiko-kineetiliste uuringute kavandamiseks on vaja paindlikkust ja uuritava kemikaali omaduste arvestamist. Mõnikord tuleb uurida ainult teatavaid küsimusi, et teha kindlaks uuritava kemikaaliga seotud ohud ja riskid. Mõnikord võib toksiko-kineetilisi andmeid koguda muus toksikoloogiauringus kemikaali hindamise osana. Muus olukorras võivad olla vajalikud ulatuslikud täiendavad toksiko-kineetilised uuringud, kui selleks on regulatiivne vajadus või tekib uuritava kemikaali hindamisel uusi küsimusi.

8. Enne käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemist peaks uurimislabor läbi vaatama kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali ja asjakohaste metaboliitide ning analoogide kohta, et parandada uuringu kvaliteeti ja vältida loomade tarbetut kasutamist. See võib hõlmata muude asjakohaste katsemeetodite andmete kasutamist (*in vivo* uuringud, *in vitro* uuringud ja/või *in silico* hindamised). Füüsikalise-keemilised omadused, näiteks kemikaali jaotustegur süsteemis oktaanool-vesi ($\log P_{OW}$), pKa, lahustuvus vees, aururõhk ja molekulmass võivad olla kasulikud uuringu planeerimisel ning tulemuste tõlgendamisel. Need on võimalik kindlaks määrata sobivate meetodite abil, nagu on kirjeldatud asjakohastes katsemeetodites.

PIIRANGUD

9. Käesolev katsemeetod ei ole ette nähtud tegelemiseks eriolukordadega (näiteks tiined või poegi imetavad loomad ja noorloomad) või võimalike jääkide hindamiseks kemikaalidega kokku puutunud loomades, keda inimene tarbib toiduks. Katsemeetodi B.36 kohase uuringu andmed võivad siiski anda taustteavet, mis aitab kavandada eriuuringuid selliste küsimuste lahendamiseks. Käesolev katsemeetod ei ole ette nähtud nanomaterjalide katsetamiseks. OECD katsejuhendite esialgse läbivaatamise aruandes, milles käsitletakse nende kohaldatavust nanomaterjalide uurimisele, on märgitud, et katsejuhend nr 417 (mis on samaväärne käesoleva katsemeetodiga B.36) ei pruugi olla kohaldatav nanomaterjalide uurimisele (1).

MÕISTED

10. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on esitatud liites.

LOOMADE HEAOLU KAALUTLUSED

11. Suunised loomade humaanse kohtlemise kohta on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19 (2). OECD juhenddokumenti nr 19 soovitatakse kasutada kõigi käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vivo* ja *in vitro* uuringute puhul.

MEETODITE KIRJELDUS**Prooviuringud**

12. Soovitatakse kasutada prooviuringuid, et valida toksiko-kineetilistel uuringutel jälgitavad parameetrid (näiteks kemikaali metaboliseerimine, massibilanss, analüüside tegemine, dooside valimine, CO₂ väljahingamine jne). Mõnda kõnealustest parameetritest saab määrata ka ilma radiomärgistatud kemikaali kasutamata.

▼ **M4****Loomade valimine***Liik*

13. Toksikokineetika katsetes kasutatav loomaliik (ja liin) peaks eelistatavalt olema sama kui asjakohase uuritava kemikaaliga tehtud muudes toksikoloogilistes uuringutes. Üldiselt tuleks kasutada rott, kuna seda liiki on toksikoloogilistes uuringutes palju kasutatud. Muu või täiendava liigi kasutamine võib olla põhjendatud, kui asjakohased toksikoloogilised uuringud näitavad märkimisväärset mürgisust kõnealuse liigi suhtes või kui mürgisus kõnealuse liigi suhtes või liigi isenditel avaldub toksikokineetika on näidatud olevat inimeste jaoks asjakohasem. Loomaliigi ja liini valikut tuleks põhjendada.
14. Kui ei ole öeldud teisiti, viidatakse käesolevas katsemeetodis katseliigina rotile. Muu katseliigi kasutamise korral võib meetodi teatavaid aspekte muuta.

Vanus ja liin

15. Tuleks kasutada noori terveid täiskasvanud loomi, kes on annustamise ajal tavaliselt 6–12 nädala vanused (vt ka punktid 13 ja 14). Muude kui noorte täiskasvanud loomade kasutamise korral tuleks seda põhjendada. Kõik loomad peaksid uuringu alguses olema sarnases vanuses. Üksiku looma kehamass ei tohiks erineda rohkem kui $\pm 20\%$ katserühma keskmisest kehamassist. Kõige parem oleks kasutada sama liini, mida kasutati uuritava kemikaali toksikoloogilise andmebaasi koostamisel.

Loomade arv ja sugu

16. Iga uuritava doosi korral tuleks kasutada vähemalt nelja samast soost looma. Kasutatud loomade soo valikut tuleks põhjendada. Kui on tõendeid, et kummagi soo puhul avaldub mürgisus erinevalt, tuleks kaaluda mõlema soo kasutamist (neli isas- ja neli emaslooma).

Pidamis- ja söötmingimused

17. Loomi tuleks katse ajal üldjuhul eraldi pidada. Eriolukorras võib olla põhjendatud rühmas pidamine. Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Katseloomade pidamise ruumi temperatuur peaks olema 22 °C ($\pm 3\text{ °C}$) ja suhteline õhuniiskus 30–70 %. Söötmisel võib kasutada tavapärasest labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata.

Uuritav kemikaal

18. Uuringu kõigi massibilansi ja metaboliitide tuvastamise andmete saamiseks tuleks kasutada ^{14}C abil radiomärgistatud uuritavat kemikaali. Kui on aga võimalik tõendada, et

— massibilanssi ja metaboliite on võimalik õigesti hinnata märgistamata uuritava kemikaaliga,

— mitteradioaktiivse uuritava kemikaaliga kasutatud meetodi analüütiline täpsus ja tundlikkus on radiomärgistatud uuritava kemikaali kasutamisega võrreldes samaväärne või suurem,

▼ **M4**

ei ole radiomärgistatud uuritavat kemikaali vaja kasutada. Samuti võib kasutada muid radioaktiivseid ja stabiilseid isotoope, eelkõige juhul, kui kõnealune element põhjustab uuritava kemikaali mürgisuse või on selle osa. Kui võimalik, peaks radiomärgis asuma molekuli metaboliseerimise suhtes stabiilses põhiosas (osa, mis ei ole vahetatav, mida ei eemaldata metaboliseerimisel CO₂-na ja mis organismis ei lähe ühe süsinikuaatomiga ühendite puuli). Uuritava kemikaali metaboliseerimise käigu väljaselgitamiseks võib olla vajalik märgistada molekulis mitu aatomit või konkreetset piirkonda.

19. Radiomärgisega ja radiomärgiseta uuritavat kemikaali tuleks asjakohaste meetodite abil analüüsida, et veenduda kemikaali puhtuses ja vastavuses keemilisele määratlusele. Radioaktiivse uuritava kemikaali radioloogiline puhtus peaks olema nii suur, kui konkreetse uuritava kemikaali puhul on võimalik saavutada (ideaaljuhul üle 95 %), ning tuleks teha mõistlikud jõupingutused, et tuvastada kõik lisandid, mida on 2 % või rohkem. Tuleb esitada andmed uuritava kemikaali puhtuse kohta ja kõikide kindlakstehtud lisandite keemilise määratluse ja osakaalu kohta. Igas regulatiivses kavas võidakse otsustada anda täiendavaid suuniseid, kuidas määratleda ja kirjeldada uuritavat kemikaali, mis kujutab endast segu, ning milliseid meetodeid tuleb kasutada selle puhtuse määramiseks.

Doosi valik*Prooviuuring*

20. Üldjuhul on prooviuuringuks piisav üks suukaudne doos. Doos ei tohiks olla mürgine, kuid peaks olema piisavalt suur, et võimaldada metaboliitide tuvastamist väljaheidetes ja väljahingatud õhus (ja plasmas, kui see on asjakohane) ning saavutada prooviuuringu nimetatud eesmärk, mis on märgitud käesoleva katsemeetodi punktis 12.

Põhiuuring

21. Põhiuuringu puhul eelistatakse vähemalt kahe doosi kasutamist, kuna vähemalt kahest doosirühmast kogutud teave võib aidata määrata doosi muudes mürgisuse uuringutes ja hinnata juba olemasolevate mürgisuse katsete mõju sõltuvust doosist.
22. Kui manustatakse kahte doosi, peaksid mõlemad doosid olema piisavalt suured selleks, et võimaldada metaboliitide tuvastamist väljaheidetes (ja plasmas, kui see on asjakohane). Doosi valimisel tuleks arvesse võtta olemasolevatest toksilisuse andmetest saadud teavet. Kui teavet (näiteks ägeda suukaudse mürgisuse või korduvdooosi mürgisuse uuringute teavet kliiniliste mürgistusnähtude kohta) ei ole, võib kaaluda suuremat annust, mis on allpool LD₅₀ (suukaudsel ja nahakaudsel manustamisel) või LC₅₀ (sissehingamise kaudu manustamisel) hinnangulist väärtust või allpool ägeda mürgisuse hinnangulise vahemiku alumist väärtust. Väiksem annus peaks olema suurema doosi mingi murdosa.
23. Ainult ühe doositaseme uurimise korral peaks doos ideaaljuhul olema piisavalt suur, et võimaldada metaboliitide tuvastamist väljaheidetes (ja plasmas, kui see on asjakohane), põhjustamata ilmset mürgistust. Teise doositaseme lisamata jätmist tuleks põhjendada.
24. Kui on vaja määrata doosi mõju kineetilistele protsessidele, ei pruugi kahest doosist piisata ja vähemalt üks neist peaks olema piisavalt suur, et saavutada kõnealusel protsessil küllastumist. Kui plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala (AUC) ei ole põhiuuringus kasutatud kahe doositaseme vahel lineaarne, on see oluline tõend, et ühe või enama kineetilise protsessi küllastumine toimub kusagil kahe doositaseme vahel.

▼ **M4**

25. Vähesse mürgisusega uuritavate kemikaalide puhul tuleks (suu- ja nahkaudse manustamise korral) kasutada maksimumdoosi 1 000 mg kehakaalu kg kohta (sissehingamise teel manustamise puhul vt suunised, käesoleva lisa peatükk B.2; üldjuhul ei ületa see doos 2 mg/l). Kemikaalist olenevalt võib regulatiivsete nõuete täitmiseks osutada vajalikuks suurema doosi kasutamine. Doosi valik peaks olema alati põhjendatud.
26. Ühe doosi toksiko-kineetilised ja kudedes jaotumise andmed võivad olla piisavad bioakumuleerumise ja/või püsivuse võimalikkuse kindlaksmääramiseks. Mõnel juhul võib siiski olla vajalik korduvdoosi manustamine, i) et käsitleda täpsemalt bioakumuleerumise ja/või püsivuse võimalikkust või muutusi toksikokineetikas (s.o näiteks ensüümide induktsioon ja inhibeermine), või ii) kui seda nõuab kohaldatav õigussüsteem. Kuigi üldjuhul piisab väikese doosi korduvast manustamisest, võib korduvdoosiuuringute puhul olla mõnedel tingimustel vajalik ka suure doosi korduv manustamine (vt punkt 57).

Uuritava kemikaali manustamine

27. Uuritav kemikaal tuleks lahustada või tekitada selle ühtlane suspensioon samas kandaines, mida on kasutatud muude suukaudse mürgisuse sündsõotmisega manustamisega uuringutes, kui kõnealune teave kandaine kohta on olemas. Kandaine valikut tuleks põhjendada. Kandaine ja dooseerimiskoguse valimist tuleks käsitleda juba uuringu koostamisel. Tavaline manustamismeetod on sündsõotmisega; manustamine želatiinkapslis või söödasegu osana võib siiski olla konkreetsetes olukorras kasulik (mõlemal juhul tuleks valitud meetodit põhjendada). Igale loomale tegelikult manustatud doosi tuleks kontrollida.
28. Suukaudsel sündsõotmisel korraga manustatava vedeliku maksimaalne kogus oleneb katselooma suurusest, doosi kandaine tüübist ja sellest, kas loomi enne uuritava kemikaali manustamist näljutatakse või mitte. Enne manustamist sööda andmist või mitteandmist tuleks põhjendada. Üldiselt peaks manustatav maht nii veepõhiste kui ka muude kandainete puhul olema nii väike, kui praktiliselt võimalik. Doosi kogus näriliste puhul ei tohiks üldiselt ületada 10 ml kehakaalu kg kohta. Lipofiilsema uuritava kemikaali puhul kasutatav kandaine kogus võiks alata 4 ml-st kehakaalu kg kohta. Korduvdoosiuuringutes, kus igapäevane näljutamine on vastunäidustatud, tuleks kaaluda väiksema doosikoguse (näiteks 2–4 ml kehakaalu kg kohta) kasutamist. Kui võimalik, tuleks püüda kasutada sellist doosikogust, mis on kooskõlas uuritava kemikaaliga tehtud muude suukaudse sündsõotmise uuringutega.
29. Uuritava kemikaali intravenooset manustamist ning uuritava kemikaali mõõtmist veres ja/või väljaheidetes võib kasutada biosaadavuse või suhtelise suukaudse imendumise määramiseks. Intravenoosse manustamise uuringu puhul manustatakse asjakohase kandaine abil üks doos uuritavat kemikaali (mis on üldiselt võrdväärne väikese suukaudse doosiga, aga ei tohi seda ületada, vt doosi valimine). Seda materjali tuleks manustada sobiv kogus (näiteks 1 ml kehakaalu kg kohta) valitud manustamiskohas vähemalt neljale asjakohasest soost loomale (kui see on põhjendatud, siis võib kasutada mõlemat sugu, vt punkt 16). Intravenoosseks manustamiseks tuleb ette valmistada uuritava kemikaali täielikult lahustatud või suspendeeritud doos. Intravenoosse manustamise kandaine ei tohiks mõjutada vere koostist

▼ **M4**

ega voolamist. Kui uuritav kemikaal kanti üle infusioonipumbaga, tuleks katseprotokollis teatada ülekandmise kiirus, mis peaks kõigi loomade puhul olema standardne. Kanüüli viimisel jugulaarveeni (uuritava kemikaali manustamiseks ja/või vere kogumiseks) või reiearterisse (uuritava kemikaali manustamiseks) tuleks kasutada tuimestust. Tuimestuse tüüpi tuleks hoollega kaaluda, kuna see võib toksikokineetikat mõjutada. Loomad peaksid saama enne uuritava kemikaali ja kandeaine manustamist piisavalt toibuda.

30. Teatava uuritava kemikaali puhul võib olla asjakohane muu manustamistee, näiteks nahakaudne või sissehingamise teel manustamine (vt punktid 74–78), olenevalt kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest ja eeldatavast kasutamisest inimeste poolt või inimestega kokkupuute teest.

Mõõtmised*Massibilanss*

31. Massibilansi määramiseks liidetakse manustatud (radioaktiivse) doosi kogused (protsent esialgsest doosist), mis leitakse uriinis, väljaheites ja väljahingatud õhus ning tehakse kindlaks kudedes, korjusejääkides ja puuripesuveidelikus (vt punkt 46). Üldiselt peetakse piisavaks, kui manustatud uuritavast kemikaalist (radioaktiivsusest) suudetakse liitmisega koguda > 90 %.

Imendumine

32. Esialgne imendumise hinnang saadakse sel teel, et massibilansi arvutusest lahutatakse seedetraktis ja/või väljaheites oleva doosi osakaal. Imendumise protsendi arvutus on esitatud punktis 33. Väljahingatava õhu, väljaheite ja uriini uurimise kohta vt punktid 44–49. Kui pärast suukaudset manustamist ei ole imendumise täpset ulatust võimalik massibilansi abil kindlaks määrata (näiteks kui üle 20 % manustatud doosist leitakse väljaheites), võib vajalik olla täpsem uuring. Kõnealune uuring võib seisneda kas 1) uuritava kemikaali suukaudses manustamises ja määramises, kui palju uuritavat kemikaali leidub sapis, või 2) uuritava kemikaali suukaudses ja intravenoosses manustamises ning uriinis leiduva uuritava kemikaali netosisalduse mõõtmises, millele liidetakse väljahingatud õhus ja korjuses leiduv uuritava kemikaali sisaldus kummagi manustamistee puhul. Mõlemas uuringuprojekts mõõdetakse radioaktiivsust uuritava kemikaali ja metaboliitide keemilise analüüsi asendusmeetodina.
33. Sapi kaudu eritamise uuringu tegemisel kasutatakse üldiselt suukaudset manustamist. Kõnealuses uuringus viiakse vähemalt nelja asjakohasest soost (vajaduse korral kummastki soost) looma sapijuhasse kanüül ja manustatakse üks doos uuritavat kemikaali. Pärast uuritava kemikaali manustamist tuleks jälgida radioaktiivsuse / uuritava kemikaali eritumist sapiga nii kaua, kui on vaja sapi kaudu eritava manustatud doosi protsendi hindamiseks, mida saab otseselt kasutada suukaudse imendumise ulatuse arvutamiseks järgmiselt:

$$\text{imendumise protsent} = \frac{(\text{kogus sapis} + \text{uriinis} + \text{väljahingatud õhus} + \text{korjuses ilma seedetrakti sisalduseta})}{\text{manustatud kogus} \times 100}$$

34. Mõne uuritavate kemikaalide klassi puhul võib imendunud doos sekreteeruda otse läbi soolestiku membraanide. Sellisel juhul loetakse, et sapijuhasse sisestatud kanüüliliga rotile suukaudselt manustatud doosi väljaheites sisalduva protsendi mõõtmine ei näita imendumata doosi protsenti. Kui oletatakse sekretsiooni otse soolestikku, soovitatakse imendunud doosi protsendi arvutamisel toetuda imendumisele, mis arvutatakse suukaudse manustamise puhul väljutamise ja intravenoosse manustamise puhul väljutamise (intaktne rott või rott, kelle sapijuhasse on viidud kanüül) võrdluse alusel (vt punkt 35). Samuti soovitatakse, et kui peetakse vajalikuks soolestiku sekretsiooni arvulist määramist, tuleks mõõta doosi väljutamist pärast doosi intravenoosset manustamist rotile, kelle sapijuhasse on viidud kanüül.

▼ **M4***Biosaadavus*

35. Biosaadavust on võimalik kindlaks määrata suukaudse ja intravenoosse manustamise rühmade plasma/vere kineetika alusel, nagu on kirjeldatud punktides 50–52, tuginedes uuritava kemikaali ja/või asjakohase metaboliidi (asjakohaste metaboliitide) keemilisele määramisele; sel juhul ei ole vaja kasutada radiomärgistatud uuritavat kemikaali. Uuritava kemikaali või asjakohase metaboliidi (asjakohaste metaboliitide) biosaadavuse (F) võib siis arvutada järgmiselt:

$$F = (AUC_{\text{exp}}/AUC_{\text{IV}}) \times (\text{Dose}_{\text{IV}}/\text{Dose}_{\text{exp}})$$

kus AUC on plasmas sisalduva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala, IV on intravenoosne ja exp on eksperimentaalne manustamine (suukaudne, nahakaudne või sissehingamise teel).

36. Süsteemsete mõjude riski hindamisel eelistatakse üldjuhul kasutada toksilise osa biosaadavust imendumise protsendi asemel, kui võrreldakse loomade uuringute süsteemseid kontsentratsioone analoogsete bioseire andmetega, mis saadakse töötajate kokkupuute uuringutest. Olukord võib olla keerukam, kui doosid on mittelineaarses vahemikus, seepärast on tähtis, et toksiko-kineetilise sõelumise raames määratakse kindlaks lineaarse vahemiku doosid.

Jaotumine kudedes

37. Teadmised uuritava kemikaali ja/või selle metaboliitide kudedes jaotumise kohta on olulised sihtkudede määramiseks ning mürgisuse aluseks olevate mehhanismide mõistmiseks, samuti teabe saamiseks uuritava kemikaali ja metaboliitide bioakumulatsiooni ja püsivuse võimalikkuse kohta. Summaarse (radioaktiivse) doosi protsenti kudedes ning samuti korjusejääkides tuleks mõõta vähemalt väljutamiskatse lõpus (näiteks üldjuhul seitse päeva pärast doosi või vähem, olenevalt uuritava kemikaali konkreetsest käitumisest). Kui uuringu lõpus uuritavat kemikaali kudedes ei tuvastata (näiteks kuna uuritav kemikaal võib olla enne uuringu lõppu lühikese poolestusaja tõttu juba kadunud), siis tuleks olla hoolikas, et vältida andmete väärtõlgendamist. Sellises olukorras tuleks uurida uuritava kemikaali (ja/või metaboliidi) jaotumist kudedes sel ajal, kui selle kontsentratsioon plasmas/veres on maksimaalne (T_{max}) või kui selle väljutamine uriini kaudu on kõige kiirem, nagu on asjakohane (vt punkt 38). Lisaks sellele võib olla vajalik kudede kogumine täiendavatel ajahetkedel, et hinnata uuritava kemikaali ja/või selle metaboliitide kudedes jaotumise sõltuvust ajast (kui see on asjakohane), et hõlbustada massibilansi määramist ja/või täita pädeva ametiasutuse esitatud nõudeid. Kogutavate kudede hulka kuuluvad maks, rasvkude, magu ja soolestik, neerud, põrn, täisveri, korjusejäägid, sihtorgani koed, samuti tuleks koguda uuritava kemikaali toksikoloogilise hindamise jaoks võimalikku tähtsust omavaid muid kudesid (näiteks kilpnääre, erütrotsüüdid, suguelundid, nahk, silm (eelkõige pigmenteerunud loomade puhul)). Tuleks kaaluda täiendavate kudede analüüsi samadel ajahetkedel, et kasutada loomi maksimaalselt, samuti juhul, kui subkroonilise või kroonilise mürgisuse uuringutes täheldatakse mürgisust sihtorgani suhtes. Samuti tuleks teada (radioaktiivsete) jääkide kontsentratsioon ning kudede ja plasma (vere) radioaktiivsuse suhtarvud.
38. Kudedes jaotumise hindamine täiendavatel ajahetkedel, näiteks siis, kui kontsentratsioon plasmas/veres on maksimaalne (näiteks T_{max}) või kui väljutamine uriini kaudu toimub suurima kiirusega, mis on kindlaks tehtud vastavate plasma/vere kineetika või väljutamise katsetega, võib samuti olla vajalik või seda võib nõuda pädev asutus. See teave võib olla vajalik mürgisuse mõistmiseks ning uuritava kemikaali ja metaboliidi bioakumulatsiooni ja püsivuse võimalikkuse hindamiseks. Tuleks esitada proovide valiku põhjendused; analüüsiproovid peaksid üldjuhul olema samad kui eespool nimetatud (vt punkt 37).

▼ **M4**

39. Kudedes jaotumise uuringutes võidakse radioaktiivsuse arvuline määramine teha vedelik-stsintillatsiooniloenduri (VSL) abil pärast seda, kui organid on välja lõigatud, homogeenitud, põletatud ja/või solubiliseeritud ning nende jäägid on kogutud ja viidud loendurisse. Praegu arendatakse mitut tehnilist meetodit, nagu kvantitatiivne kogu keha autoradiograafia ja retseptori mikroskoop-autoradiograafia, mis võivad osutada kasulikuks uuritava kemikaali organites ja/või kudedes jaotumise määramisel (3, 4).
40. Muu kui suukaudse kokkupuute puhul tuleks koguda ja analüüsida konkreetseid kudesid, näiteks inhalatsiooniuringute puhul kopsu ja naha-kaudsete uuringute puhul nahka. Vt punktid 74–78.

Metaboliseerimine

41. Väljaheited (ja plasma, kui see on asjakohane) tuleks koguda muutumata uuritava kemikaali ja metaboliitide tuvastamiseks ja arvuliseks määramiseks, nagu on kirjeldatud punktides 44–49. Metaboliitide tuvastamise lihtsustamiseks on lubatud koondada ühe doosirühma väljaheited. Soovitav on iga ajahetke jaoks määrata metaboliidiprofiil. Kui proovide ja/või radioaktiivsuse puudumine seda ei võimalda, siis on lubatud koondada mitme ajahetke uriini ja fekaalid, kuid sugude- ja doosidevaheline koondamine ei ole lubatud. Uuritava kemikaaliga töödeldud loomade uriini, fekaalide, väljahingatud radioaktiivsuse ja sapi (kui see on asjakohane) analüüsimiseks tuleks kasutada sobivaid kvalitatiivseid ja kvantitatiivseid meetodeid.
42. Tuleks teha mõistlikud jõupingutused, et määrata kindlaks kõik metaboliidid, mille kogus on vähemalt 5 % manustatud doosist, ning esitada uuritava kemikaali metaboliseerimise skeem. Tuleks kindlaks teha uuritavad kemikaalid, mida on väljaheidetes vähemalt 5 % manustatud doosist. Tuvastamine tähendab siin koostisainete täpse struktuuri määramist. Üldiselt toimub keemilise struktuuri määramine nii, et metaboliiti ja teadaolevaid võrdlusaluseid kromatografeeritakse kahes erinevas süsteemis, või kasutatakse meetodeid, mille abil on võimalik otse määrata keemilist struktuuri, näiteks massispektromeetria, tuumamagnetresonants jne. Kromatograafia puhul ei peeta metaboliidi struktuuri kahe meetodi abil tõendamisel piisavaks seda, kui kromatograafiat tehakse kahe erineva lahustisüsteemiga, kuid sama statsionaarse faasiga, kuna need meetodid ei ole sõltumatud. Kromatograafiline tuvastamine peaks toimuma kahe sõltumatu analüüsisüsteemiga, näiteks tavaline ja pöördfaasi õhukese kihi kromatograafia ning kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC). Kui kromatograafiline eraldamine on piisava kvaliteediga, ei ole täiendav spektroskoopiline kinnitamine vajalik. Alternatiivselt võib ühese tuvastamise saavutada struktuuriteavet andvate meetoditega, näiteks vedelikkromatograafia pluss massispektromeetria (LC-MS) või vedelikkromatograafiaga tandemisse ühendatud massispektromeetria (LC-MS/MS), gaaskromatograafia pluss massispektromeetria (GC-MS) ning tuumamagnetresonantspektromeetria.
43. Kui ei ole võimalik tuvastada metaboliite, mida on vähemalt 5 % manustatud doosist, tuleks lõpparuandes seda põhjendada või selgitada. Võib olla asjakohane tuvastada sellised metaboliidid, mille kogus on vähem kui 5 % manustatud doosist, et ohu ja/või riski hindamiseks mõista paremini uuritava kemikaali metaboliseerimisteed. Võimaluse korral tuleks esitada struktuuri kinnitus. See võib hõlmata plasmas, veres või muudes kudedes tekkivate metaboliidiprofilide esitamist.

▼ **M4***Eritumine*

44. Tuleks kindlaks teha manustatud doosi eritumise kiirus ja ulatus; selleks mõõdetakse uriinis, fekaalides ja väljahingatud õhus leitud (radioaktiivse) doosi protsent. Neid andmeid saab kasutada ka massibilansi määramiseks. Uriini, fekaalide ja väljahingatud õhuga organismist väljunud uuritava kemikaali (radioaktiivsuse) kogused tuleks kindlaks määrata sobivate ajavahemike järel (vt punktid 47–49). Korduvdooi katsed tuleks asjakohaselt kavandada, et eritumise andmete kogumisel oleks võimalik järgida punktis 26 sätestatud eesmärgi. See võimaldab võrdlemist ühe doosi katsetega.
45. Kui prooviuuringust selgub, et uuritavat kemikaali (radioaktiivsust) (punkti 49 kohaselt) ei ole väljahingatud õhuga märkimisväärses koguses väljutatud, ei ole lõpliku uuringu ajal vaja väljahingatud õhku koguda.
46. Iga loom tuleb paigutada eraldi metaboolsesse üksusesse väljaheidete (uriini, fekaalide) ja väljahingatud õhu kogumiseks. Iga kogumisajavahemiku lõpus (vt punktid 47–49) tuleks metaboolsed üksused asjakohase lahustiga loputada (seda nimetatakse puuri loputamiseks), et tagada uuritava kemikaali (radioaktiivsuse) maksimaalne kogumine. Väljaheidete ja väljahingatud õhu kogumine tuleks lõpetada seitsme päeva möödudes või kui vähemalt 90 % manustatud doosist on kogutud, olenevalt sellest, kumb kriteerium enne täidetakse.
47. Uuritava kemikaali (radioaktiivsuse) summaarsed kogused uriinis määratakse kindlaks vähemalt kahel ajahetkel kogumise 1. päeva kohta, millest üks peaks olema 24 tundi pärast doseerimist, ja seejärel üks kord päevas kuni uuringu lõpuni. Soovitav on 1. päeval kasutada rohkem kui kahte proovi kogumise ajahetke (näiteks 6, 12 ja 24 tundi pärast doseerimist) valimist. Prooviuuringute tulemusi tuleks analüüsida, et saada teavet proovi kogumise alternatiivsete või täiendavate ajavahemike kohta. Kogumise ajakava tuleks põhjendada.
48. Uuritava kemikaali (radioaktiivsuse) summaarsed kogused fekaalides tuleks kindlaks määrata iga päev pärast 24 tunni möödumist manustamisest kuni uuringu lõpuni, v.a juhul, kui prooviuuringutest tuleneb, et kogumiseks tuleb kasutada muid või täiendavaid ajavahemikke. Kogumise alternatiivset ajakava tuleks põhjendada.
49. Väljahingatud CO₂ ja muude lenduvate materjalide kogumise võib konkreetses uuringus peatada, kui väljahingatud õhus leitakse pärast 24-tunnist kogumist vähem kui 1 % manustatud doosist.

Mõju ajast sõltuvuse uuringud*Plasma/vere kineetika*

50. Kõnealuste uuringute eesmärk on hinnata uuritava kemikaali peamised toksiko-kineetilised parameetrid (näiteks C_{max}, T_{max}, poolestusaeg (t_{1/2}), plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala (AUC)). Kõnealused uuringud võib teha ühe doosiga või tõenäoliselt kahe või enama doosiga. Doosid tuleks valida eksperimendi laadi ja/või uuritava probleemküsümise alusel. Kineetilised andmed võivad olla vajalikud, et lahendada selliseid küsimusi nagu uuritava kemikaali biosaadavus ja/või selgitada, kuidas kehast väljutamine sõltub doosist (näiteks selgitada, kas väljutamisel esineb küllastumine alates mingist doosist).
51. Kõnealuste uuringute puhul tuleks kasutada doosirühmas vähemalt nelja ühest soost looma. Kasutatud loomade soo valikut tuleks põhjendada. Tuleks kaaluda mõlema soo kasutamist (neli isas- ja neli emaslooma), kui on tõendeid, et mürgisus on oluliselt soost.

▼ **M4**

52. Pärast (radiomärgistatud) uuritava kemikaali manustamist tuleks igalt loomalt võtta sobival ajal vereproovid, kasutades asjakohast proovivõtu meetodikat. Loomalt võetavate vereproovide kogus ja arv võib olla piiratud korduva proovivõtu võimaliku mõjuga looma tervisele/füsioloogiale ja/või analüüsimeetodi tundlikkusega. Iga looma proove tuleks analüüsida eraldi. Mõnikord (näiteks metaboliidi iseloomustamine) võib olla vajalik rohkem kui ühe looma proovide koondamine. Koondatud proovid tuleks selgelt märgistada ja esitada koondamise selgitus. Kui kasutatakse radiomärgistatud uuritavat kemikaali, siis võib olla vajalik esineva koguradioaktiivsuse analüüs. Kui see on nii, tuleks radioaktiivsust analüüsida täisveres ja plasmas või plasmas ja punastes verelibledes, et oleks võimalik arvutada vere ja plasma omavahelist suhet. Muudel juhtudel võivad olla vajalikud täpsemad uuringud, mille puhul on vaja määrata lähteühendit ja/või metaboliite või hinnata nende seostumist valkudega.

Muude kudede kineetika

53. Kõnealuste uuringute eesmärk on hankida teavet mõju ajast sõltuvuse kohta, et saada vastused sellistele küsimustele nagu mürgisuse mehhanism, bioakumulatsioon ja biopüsivus, milleks määratakse kindlaks uuritava kemikaali sisaldus eri kudedes. Kudede ja hindamisajavahemike valik oleneb käsitletavast küsimusest ning uuritava kemikaali toksikoloogilisest andmebaasist. Kõnealuse täiendavate kudede kineetikauuringu kavandamisel tuleks võtta arvesse kogutud teavet, nagu on kirjeldatud punktides 37–40. Kõnealused uuringud võivad hõlmata ühe või mitme doosi manustamist. Kasutatavat lähenemisviisi tuleks üksikasjalikult põhjendada.

54. Muude kudede kineetiliste uuringute tegemise võimalikud põhjused on järgmised:

— tõendid pikendatud poolestusaja kohta veres, mis viitab uuritava kemikaali võimalikule kogunemisele mitmesugustes kudedes, või

— vajadus kindlaks teha, kas konkreetses koes on saavutatud statsionaarne olek (näiteks korduvdoosi uuringutes; kuigi veres võib uuritava kemikaali kontsentratsiooniga olla saavutatud statsionaarne olek, võib pakkuda huvi küsimus, kas statsionaarne olek on saavutatud ka sihtkudedes).

55. Seda tüüpi mõju ajast sõltuvuse uuringutes tuleks asjakohane uuritava kemikaali doos manustada suukaudselt vähemalt neljale loomale iga doosi ja iga määratud ajahetke kohta ning tuleks jälgida valitud kudedes jaotumise ajaliskulgu. Võib kasutada ainult ühte sugu, v.a juhul, kui on täheldatud mürgisuse sõltuvust soost. See, kas analüüsitakse summaarset radioaktiivsust või lähtekemikaali ja/või metaboliite, oleneb ka probleemküsimusest, millega tegeldakse. Kudedes jaotumist tuleks hinnata asjakohaste meetodite abil.

Ensüümide induktsioon või inhibeerimine

56. Ensüümide induktsiooni (sünteesi esilekutsumise) või inhibeerimise võimaliku mõju uurimine või uuritava kemikaali biotransformatsiooni uurimine võib olla vajalik järgmistel juhtudel:

1) olemasolevad tõendid osutavad, et uuritava kemikaali mürgisust suurendab biotransformatsioon;

2) olemasolevad tõendid osutavad, et metaboliseerimine ei sõltu doosist lineaarselt;

▼ **M4**

- 3) metaboliitide määramise uuring näitab võimaliku mürgise metaboliidi olemasolu, mis võib olla tekkinud uuritava kemikaali poolt indutseeritud ensümaatilise raja kaudu;
 - 4) on vaja kontrollida hüpoteesi, et uuritava kemikaali mõju on seotud ensüümi induktsiooni nähtustega;
 - 5) kui uuritava kemikaali metaboliseerimise profiilis täheldatakse kas märkimisväärsed toksikoloogilisi muutusi *in vitro* või *in vivo* katsetes muude liikidega või muudes tingimustes, võib olla vajalik asjakohas(t)e ensüümi(de) iseloomustamine (näiteks I faasi ensüümid, nagu tsütokroom P450-sõltuva monooksügenaasi süsteemi isoenüümid, II faasi ensüümid, nagu sulfotransferaasi isoenüümid või uridiindifosfaat-glükuronosüültransferaasi isoenüümid või muud asjakohased ensüümid). Seda teavet võib kasutada, et hinnata mehhanismide liigilt liigile ülekandmise lubatavust.
57. Uuritava kemikaaliga seotud toksiko-kineetiliste muutuste hindamiseks tuleks kasutada sobilikke nõuetekohaselt valideeritud ja põhjendatud katse-eeskirju. Näidisuuringuprojekt hõlmab määramata uuritava kemikaaliga korduvdoosi manustamist, millele järgneb ühekordne radiomärgistatud doos 14. päeval või radiomärgistatud uuritava kemikaaliga korduvdoos ning proovide võtmine 1., 7. ja 14. päeval metaboliidiprofiilide kindlaksmääramiseks. Radiomärgistatud uuritava kemikaali dooside korduv manustamine võib anda teavet ka bioakumulatsiooni kohta (vt punkt 26).

TÄIENDAVAD LÄHENEMISVIISID

58. Muud lähenemisviisid, mis täiendavad käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vivo* katseid, võivad teatavate liikide puhul anda kasulikku teavet uuritava kemikaali imendumise, jaotumise, metaboliseerimise või organismist kõrvaldamise kohta.

***In vitro* teabe kasutamine**

59. Mitmeid uuritava kemikaali metaboliseerimise küsimusi on võimalik käsitleda *in vitro* uuringutes, kasutades asjakohaseid katsesüsteeme. Võimalike metaboliitide uurimiseks võib kasutada maksa subtsellulaarse tasandi osakesi (näiteks mikrosoome ja tsütosooli või S9-fraktsiooni) ja värskest eraldatud või kultuuris kasvatatud hepatotsüüte. Riskihindamisel võib huvi pakkuda lokaalne metaboliseerimine sihtorgan, näiteks kopsus. Selleks otstarbeks võib olla kasulik sihtkoe mikrosoomide fraktsioon. Mikrosoomiuuringud võivad olla kasulikud võimalike sooliste ja vanuseliste erinevuste selgitamiseks ning aidata leida ensüümiparameetreid (K_m ja V_{max}), mis võivad aidata hinnata metaboliseerimise sõltuvust doosist, arvestades kokkupuutetasemeid. Lisaks võivad mikrosoomiuuringud aidata määrata konkreetseid mikrosoomienüüme, mis osalevad uuritava kemikaali metaboliseerimises ja mille mõju võib vahest oletada ka muude liikide puhul (vt ka punkt 56). Biotransformatsiooni induktsiooni võimalust võib samuti uurida, kasutades selliste loomade maksa subtsellulaarseid fraktsioone (näiteks mikrosoome ja tsütosooli), keda on eelnevalt töödeldud asjakohase uuritava kemikaaliga, tehes hepatotsüütide induktsiooni *in vitro* uuringuid või kasutades teatavaid rakuliini, milles sünteesitakse asjaomaseid ensüüme. Teatavatel asjaoludel ja sobivates tingimustes võib kaaluda inimkudedest pärinevate subtsellulaarsete fraktsioonide kasutamist biotransformatsiooni võimalike liigierinevuste kindlakstegemiseks. *In vitro* uuringud võivad olla kasulikud ka füsioloogial põhinevate toksikokineetika mudelite koostamiseks (5).

▼ **M4**

60. Nahakaudse imendumise *in vitro* uuringutest võib saada lisateavet imendumise iseloomustamiseks (6).
61. Samasuguste küsimuste lahendamiseks, milleks kasutatakse maksa mikrosoome, võib kasutada ka maksa primaarsete rakkude kultuure ja värsket koe lõikeid. Mõnikord võib konkreetsele küsimusele vastuse leidmiseks kasutada rakuliini, mille puhul asjakohase ensüümi ekspresioon on tõendatud, või insenergeneetilist rakuliini. Mõnel juhul võib olla kasulik uurida *in vitro* konkreetsete tsütokroomi P450 isosüümide (näiteks CYP1A1, 2E1, 1A2 ja muud) ja/või II faasi ensüümide induktsiooni ja inhibeerimist lähteühendi poolt. Saadud teave võib olla kasulik samalaadse struktuuriga ühendite puhul.

Mürgisusuuringute toksiko-kineetiliste andmete kasutamine lisateabena

62. Muude mürgisuse uuringute käigus saadud vere, kudede ja/või väljaheidete proovide analüüsist võib saada andmeid biosaadavuse, plasma kontsentratsiooni ajast sõltuvuse (plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala (AUC), C_{max}), bioakumulatsiooni võimalikkuse, kliirensi kiiruse ning metaboliseerimise ja kineetika sooliste erinevuste või vanuselist muutuste kohta.
63. Uuringu projekti kavandamist võib kasutada vastuste leidmiseks küsimustele, mis on seotud järgmisega: imendumise küllastumine, biotransformatsioon või väljutamise teed suuremate dooside korral; uute metaboliseerimisradade sisselülitumine suurematel doosidel ning mürgiste metaboliitide esinemine vaid suurematel doosidel.
64. Muud ohu hindamisega seotud küsimused võivad olla näiteks järgmised:
- tundlikkuse sõltuvus vanusest seoses hematoentsefaalse barjääri, neerude ja/või detoksifitseerimisvõime ealiste muutustega;
 - erinev tundlikkus alampopulatsioonides biotransformatsioonivõime või muude toksiko-kineetiliste erinevuste tõttu;
 - kokkupuute ulatus loote puhul, kuna kemikaal suudab läbida platsentat, või vastündinu puhul, kuna kemikaal läheb rinnapiima sisse.

Toksiko-kineetilise modelleerimise kasutamine

65. Toksiko-kineetilised mudelid võivad olla kasulikud ohu ja riski hindamise erinevate tahkude jaoks, näiteks süsteemse kokkupuute ning koesisese doosi ennustamine. Lisaks sellele võidakse käsitleda toimeviisiga seotud konkreetseid küsimusi ja need mudelid võivad olla aluseks andmete ekstrapoleerimisel muudele liikidele, kokkupuuteteedele ja doseerimismustritele ning aidata hinnata inimest ohustavat riski. Uuritava kemikaali füsioloogial põhineva toksiko-kineetilise mudeli koostamiseks kasulikud andmed on iga liigi puhul järgmised: 1) jaotuskoeffitsiendid, 2) biokeemilised konstandid ja füsioloogilised parameetrid, 3) manustamistest sõltuvad imendumise parameetrid ning 4) *in vivo* kineetilised andmed mudeli hindamiseks (näiteks asjakohaste (> 10 %) väljutamisteede kaudu organismist väljaviimise (kliirensi) parameetrid, metaboliseerimise K_m ja V_{max}). Mudeli koostamisel kasutatakse katseandmed tuleks saada teaduslikult põhjendatud meetodeid kasutades ning mudeli tulemused tuleks valideerida. Sageli määratakse uuritava kemikaali ja liigipõhised parameetrid, näiteks imendumise kiirused, veres ja kudedes jaotumise ning metaboliseerimise kiiruse konstandid, et lihtsustada mittekompartmentaalsete või füsioloogial põhinevate mudelite koostamist (7).

▼ **M4****KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**

66. Uuringu protokoll soovitatakse varustada sisukorraga.

Protokolli tekstiosa

67. Protokolli tekstiosa peaks sisaldama kõnealuse katsemeetodiga hõlmatud teavet, mis on jaotatud osadesse ja lõikudesse järgmiselt.

Kokkuvõte

68. See uuringuprotokolli osa peaks sisaldama uuringuprojekti ülevaadet ja kasutatud meetodite kirjeldust. Selles tuleks samuti tuua esile peamised tulemused, mis on seotud massibilansi, metaboliitide laadi ja olulisuse, kudedes olevate jääkide, kliirensi kiirusega, bioakumulatsiooni võimalikkuse, sooliste erinevustega jne. Ülevaade tuleks esitada piisavalt üksikasjalikult, et uuringu tulemusi oleks võimalik hinnata.

Sissejuhatus

69. See uuringuprotokolli osa peaks sisaldama uuringu eesmärke, põhjendust ja kava ning asjakohaseid viiteid ja taustteavet.

Materjalid ja meetodid

70. Selles uuringuprotokolli osas tuleks esitada kogu asjakohase teabe üksikasjalik kirjeldus, mis hõlmab järgmist.

a) Uuritav kemikaal

Selles jaotises tuleks esitada uuritava kemikaali tunnusandmed: keemiline nimetus, molekuli struktuur, keemilise koostise kvalitatiivne ja kvantitatiivne määramine, keemiline puhtus ja võimaluse korral lisandite tüüp ja kogused. Samuti esitatakse teave füüsikaliste ja keemiliste omaduste kohta, sh füüsikaline olek, värvus, lahustuvus ja/või jaotuskoeffitsient, stabiilsus ja vajaduse korral söövitav toime. Kui see on kohaldatav, tuleks esitada isomeere käsitlev teave. Radiomärgistatud uuritava kemikaali kohta tuleks selles jaotises esitada järgmine teave: radionukliidi tüüp, märgise asukoht, eriaktiivsus ja radiokeemiline puhtus.

Tuleks esitada kandeaine, lahjendusvedeliku, suspendeerimisvahendi ja emulgaatori või muude uuritava kemikaali manustamisel kasutatavate materjalide tüüp või kirjeldus.

b) Katseloomad

Selles jaotises peaks olema teave katseloomade, sh nende valimise kohta; tuleks põhjendada, miks valiti konkreetne liik, liin ja loomade vanus uuringu alguses, sugu, ning esitada andmed kehakaalu, tervisliku seisundi ja loomade pidamise tingimuste kohta.

c) Meetodid

See jaotis peaks sisaldama andmeid uuringu kava ja kasutatud meetodi kohta. Tuleks kirjeldada järgmist:

- 1) kokkupuutete ja -tingimuste kõigi muudatuste põhjendus, kui see on kohaldatav;

▼ **M4**

- 2) doositasemete valiku põhjendus;
- 3) põhiuuringu eksperimentaalse osa kavandamiseks tehtud prooviuuringute kirjeldus, kui see on kohaldatav. Tuleks esitada prooviuuringu alusandmed;
- 4) kuidas valmistati doseerimislahus ning lahusti või kandeaine tüüp, kui seda kasutati;
- 5) katserühmade arv ja loomade arv rühmas;
- 6) doositasemed ja kogus (ning doosi eriaktiivsus, kui kasutati radioaktiivset märgist);
- 7) manustamistee(d) ja -meetodid;
- 8) manustamise sagedus;
- 9) näljutamise ajavahemik (kui loomi näljutati);
- 10) summaarne radioaktiivsus looma kohta;
- 11) loomade kohtlemine;
- 12) proovide kogumine ja ettevalmistamine;
- 13) metaboliitide eraldamiseks, koguse määramiseks ja kindlakstegemiseks kasutatud analüüsimeetodid;
- 14) kasutatud meetoditega tuvastamise piir;
- 15) muud kasutatud eksperimentaalsed mõõtmised ja protseduurid (sh metaboliitide analüüsi meetodite valideerimine).

d) Statistiline analüüs

Kui uuringutulemuste analüüsimiseks kasutati statistilist analüüsi, tuleks lisada piisav teave kasutatud analüüsimeetodi ja arvutiprogrammi kohta, et sõltumatu hindaja või statistik saaks analüüsi uuesti hinnata ja rekonstrueerida.

Kui tehakse süsteemi modelleerimise uuringuid, nagu füsioloogial põhineva toksikokineetika mudeli uuring, tuleks mudel esitada koos täieliku kirjeldusega, et mudelit saaks sõltumatult rekonstrueerida ja valideerida (vt punkt 65 ja liide „Mõisted“)

Tulemused

71. Kõik andmed tuleks esitada tabelites koos asjakohase statistilise töötlusega, andmete kokkuvõtte tuleks esitada kõnealuse jaotise tekstiosas. Uuringu jaoks asjakohasel viisil tuleks esitada radioaktiivsuse loendusandmete kokkuvõtte; üldiselt esitatakse andmed mikro- või milligrammekvivalentidena proovi massiühiku kohta, kuid võib kasutada ka muid ühikuid. Selles jaotises tuleks tulemused esitada graafiliselt, lisada tüüpilised kromatograafia ja spektromeetria graafilised andmed, metaboliitide tuvastamise ja kvantitatiivse määramise graafikud, oletatavad metaboliseerimisteed, sh metaboliitide molekulaarne struktuur. Kõnealuses jaotises esitatakse veel järgmine teave, kui see on kohaldatav:

- 1) radioaktiivsuse kogus ja taasleitud radioaktiivsuse protsent uriinis, fekaalides, väljahingatud õhus ning uriini ja fekaale sisaldavas puuriloputusvedelikus.

— Nahakaudse uuringu puhul tuleks samuti lisada andmed manustamiskoha nahast ja nahaloputusest uuritava kemikaali taasleidmise kohta ning jääradioaktiivsuse kohta nahka katnud seadmetes ja metaboliseerimise uurimise üksuses ning samuti nahaloputusuuringu tulemused. Üksikasjalikuma käsitluse kohta vt punktid 74–77.

▼ **M4**

- Inhalatsiooniuringute puhul lisage samuti andmed uuritava kemikaali taasleidmise kohta kopsudes ja nina kudedes (8). Üksikasjalikuma käsitluse kohta vt punkt 78;
- 2) jaotus kudedes protsendina manustatud doosist ja kontsentratsioonina (mikrogramm-ekvivalente koe grammi kohta) ning koes ja veres leiduva kemikaali või koes ja plasmas leiduva kemikaali suhtena;
- 3) materjalibilanss, mis on arvatud igast uuringust, mis hõlmab kehakudedes ja väljaheidetes analüüsimist;
- 4) plasmakontsentratsioonid ja toksiko-kineetilised parameetrid (biosaadavus, plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala (AUC), Cmax, Tmax, kliirens, poolestusaeg) pärast asjakohas(t)e kokkupuutetee(de) kaudu manustamist;
- 5) uuritava kemikaali imendumise kiirus ja ulatus pärast asjakohas(t)e kokkupuutetee(de) kaudu manustamist;
- 6) väljaheidetest kogutud uuritava kemikaali ja metaboliitide kogused (väljendatuna manustatud doosi protsendina);
- 7) viide liite andmetele, mis sisaldavad kõiki mõõdetud näitajate andmeid iga üksiku looma kohta (näiteks doosi manustamine, taasleitud koguse protsent, kontsentratsioonid, toksiko-kineetilised parameetrid jne);
- 8) väljapakutud metaboliseerimisteede joonis ning metaboliidimolekulide struktuurid.

Arutelu ja järeldused

72. Selles jaotises peaks(id) autor(id)
- 1) esitama uuritava kemikaali metaboliseerimistee, toetudes metaboliseerimise ja organismist kõrvaldamise tulemustele;
 - 2) käsitlema uuritava kemikaali organismist kõrvaldamise ja/või biotransformatsiooni kõiki võimalikke liikide- ja sugudevahelisi erinevusi;
 - 3) esitama tabelina andmed metaboliitide tuvastamise ja koguste, kliirensi ja bioakumulatsiooni võimalikkuse kohta, lähteaine ja/või metaboliidi/metaboliitide jääkide taseme kohta kudedes ning toksikokineetika parameetrite võimaliku doosist sõltuva muutumise kohta, nagu on asjakohane, ja arutama kõike nimetatut;
 - 4) lisama kõnealusesse jaotisesse kõik asjakohased mürgisuse uuringutest saadud toksiko-kineetilised andmed;
 - 5) esitama lühikese järelduse, mida toetavad kõnealuse uuringu tulemused;
 - 6) lisama jaotisi (kui see on vajalik või asjakohane).
73. Kirjanduse andmete, tabelite, jooniste, liidete jne lisamiseks tuleks kasutada täiendavaid jaotisi.

▼ **M4**

ALTERNATIIVSED KOKKUPUUTETEEDE

Nahakaudne*Nahakaudne töötlemine*

74. Selles jaotises esitatakse üksikasjalik teave uuritava kemikaali toksikokineetika uurimise kohta nahakaudse kokkupuute korral. Nahakaudse imendumise kohta tuleks vaadata käesoleva lisa peatükki B.44 („Nahakaudne imendumine: *in vivo* meetod” (9)). Muude näitajate puhul, näiteks jaotumine ja metaboliseerimine, võib kasutada käesolevat katsemeetodit B.36. Nahakaudsel töötlemisel tuleks kasutada uuritava kemikaali ühte või enam doositaset. Uuritav kemikaal (st puhas, lahjendatud või segu koostisse viidud materjal, mis sisaldab nahale kantavat uuritavat kemikaali) peaks olema sama, millega inimene või muu loomaliigi esindaja võib kokku puutuda (või selle lähedane aine). Doositase(med) tuleks valida kooskõlas käesoleva katsemeetodi punktidega 20–26. Asjaolud, mida võiks nahakaudse doosi valimisel arvesse võtta, on eeldatav inimeste kokkupuude ja/või doosid, mille juures muudes nahakaudsete mürgisuse uuringutes täheldati mürgisust. Nahakaudne (nahakaused) doos(id) tuleks vajaduse korral lahustada sobivas kandaines ning peale kanda mahus, mis on piisav doosi manustamiseks. Vahetult enne katset eemaldatakse pügamise teel katseloomi keha seljaosalt karvkate. Võib kasutada raseerimist, kuid seda tuleb teha umbes 24 tundi enne uuringu algust. Karvkatte pügamisel või raseerimisel tuleks vältida naha marrastamist, kuna see võib mõjutada naha läbilaskvust. Uuritava kemikaali manustamiseks tuleks paljastada ligikaudu 10 % keha pinnast. Väga toksilise aine puhul võib kasutada väiksemat nahapinda kui ligikaudu 10 %, kuid võimalikult suur osa alast tuleks katta õhukese ja ühtlase kihiga. Kõigi nahakaudse kokkupuute katserühmade puhul tuleks kasutada sama töötlemise pindala. Doosiga kaetud alasid tuleb kaitsta sobiva kattega, mis kinnitatakse paigale. Loomi tuleks pidada eraldi.
75. Tuleks teha naha pesemise uuring, et hinnata pealekantud uuritava kemikaali kogust, mida on võimalik töödeldud nahalt pehmetoimelise seebi ja veega pesemise teel eemaldada. Uuritava kemikaali nahakaudse manustamise korral võib kõnealune uuring aidata koostada ka massibilanssi. Kõnealuse naha pesemise uuringu jaoks tuleks kahele loomale kanda peale üks doos uuritavat kemikaali. Doositase valitakse vastavalt käesoleva katsemeetodi punktile 23 (vt ka nahaga kokkupuute aja käsitlus, punkt 76). Pesemisel maha tulevad uuritava kemikaali kogused tuleks määrata, et hinnata, kui tõhus on uuritava kemikaali eemaldamine pesemise teel.
76. Uuritav kemikaal tuleks kanda nahale ja hoida seda nahal vähemalt kuus tundi, kui seda ei välista kemikaali söövitav toime. Pärast katte eemaldamist tuleks töödeldud pinda pesta, järgides naha pesemise uuringu jaoks kirjeldatud korda (vt punkt 75). Nii katet kui ka pesuvedelikku tuleks analüüsida uuritava kemikaali jääkide kindlakstegemiseks. Uuringu lõpus tuleks iga loom kooskõlas punktiga 2 humaansel viisil surmata ja töödeldud nahk tuleks eemaldada. Töödeldud naha asjakohast osa tuleks analüüsida, et määrata kindlaks uuritava kemikaali jäägid (radioaktiivsus).
77. Ravimite toksiko-kineetiliseks hindamiseks võivad vajalikud olla erinevad protseduurid kooskõlas asjakohase õigusraamistikuga.

▼ **M4****Hingamisteede kaudu**

78. Tuleks kasutada uuritava kemikaali ühte kontsentratsiooni (või vajaduse korral mitut kontsentratsiooni). Kontsentratsioon(id) tuleks valida kooskõlas käesoleva katsemeetodi punktidega 20–26. Sissehingamise teel manustamine tehakse nn ninakoonuse või ainult peaseadme abil, et vältida imendumist muude kokkupuuteteede kaudu (8). Kui kasutatakse muid sissehingamise teel toimuva kokkupuute tingimusi, tuleks tingimuste muutmine dokumenteerida. Sissehingamise teel toimuva kokkupuute kestus tuleks kindlaks määrata; tavaline kokkupuuteaeg on 4–6 tundi.

KIRJANDUS

- 1) OECD (2009). Preliminary Review of OECD Test Guidelines for their Applicability to Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 15, ENV/JM/MONO(2009)21, OECD, Paris.
- 2) OECD (2000). Guidance Document on Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation; Environmental Health and Safety Publications, Series on Testing and Assessment No 19, ENV/JM/MONO(2000), OECD, Paris.
- 3) Solon E G, Kraus L (2002). Quantitative whole-body autoradiography in the pharmaceutical industry; Survey results on study design, methods, and regulatory compliance, *J Pharm and Tox Methods* 46: 73–81.
- 4) Stumpf WE (2005). Drug localization and targeting with receptor microscopic autoradiography. *J. Pharmacological and Toxicological Methods* 51: 25–40.
- 5) Loizou G, Spendiff M, Barton HA, Bessems J, Bois FY, d'Yvoire MB, Buist H, Clewell HJ 3rd, Meek B, Gundert-Remy U, Goerlitz G, Schmitt W. (2008). Development of good modelling practice for physiologically based pharmacokinetic models for use in risk assessment: The first steps. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 50: 400–411.
- 6) Käesoleva lisa peatükk B.45 „Nahakaudne imendumine: *in vitro* meetod”.
- 7) IPCS (2010). Characterization and application of Physiologically-Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment. IPCS Harmonization Project Document No 9. Geneva, World Health Organization, International Programme on Chemical Safety.
- 8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing, Series on Testing and Assessment No. 39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- 9) Käesoleva lisa peatükk B.44 „Nahakaudne imendumine: *in vivo* meetod”.
- 10) Barton HA, *et al.* (2006). The Acquisition and Application of Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion (ADME) Data in Agricultural Chemical Safety Assessments, *Critical Reviews in Toxicology* 36: 9–35.
- 11) Gibaldi M and Perrier D, (1982), *Pharmacokinetics*, 2nd edition, Marcel Dekker, Inc., New York.

▼ **M4***Liide***MÕISTED**

ADME – lühend sõnadest *Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion* (imendumine, jaotumine, metaboliseerimine ja väljutamine).

Akumulatsioon (bioakumulatsioon) – uuritava kemikaali koguse suurenemine aja jooksul kudedes (tavaliselt rasvkoes, korduva kokkupuute korral); kui uuritava kemikaali kehasse sisenemise kiirus on suurem kui kehast väljaviimise kiirus, siis organism akumuleerib uuritavat kemikaali ja võib tekkida uuritava kemikaali toksiline kontsentratsioon.

Analoogmeetod – ühe või enama kemikaali näitajaid käsitleva teabe kasutamine sihtkemikaali näitajate prognoosimiseks.

AUC (plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala) – plasmas oleva uuritava aine kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alune pindala. See vastab eelnevalt kindlaks määratud aja jooksul kehasse imendunud uuritava kemikaali üldkogusele. Lineaarsetes tingimustes on AUC (aja nullpunktist lõpmatuseeni) võrdelises sõltuvuses kehasse imendunud uuritava kemikaali summaarsest kogusest, olenemata imendumise kiirusest.

Autoradiograafia (kogu keha autoradiograafia) – seda kasutatakse koes radioaktiivse uuritava kemikaali asukoha kvalitatiivseks ja/või kvantitatiivseks kindlaksmääramiseks; selle meetodi puhul kasutatakse röntgenfilmi või viimasel ajal digitaalsete fosforkujutisi, et visualiseerida radioaktiivselt märgistatud molekule või molekulosi, salvestades uuritava objekti kiiratud radioaktiivsuse. Kvantitatiivsel kogu keha autoradiograafial võivad uuritava kemikaali jaotumise hindamisel ning kudedes radioaktiivse aine taasleitud üldkoguse ja lahutusvõime hindamisel olla mõned eelised võrreldes organite lahkamisega. Üks oluline eelis näiteks on võimalus kasutada seda pigmenteeritud loomamudeli puhul, et hinnata uuritava kemikaali võimalikku sidumist melaniiniga, mis võib teatavaid molekule siduda. Kuigi see meetod võib suure mahu ja vähese afiinsusega sidumiskohtadest kogu kehas ülevaate saamiseks olla kasulik, võib meetod olla piiratud konkreetsete sihtobjektide tuvastamisega, näiteks retseptorsidumiskohade tuvastamisega, mille puhul tuvastamiseks on vaja suhteliselt suurt eraldusvõimet ja tundlikkust. Kui kasutatakse autoradiograafiat, tuleks manustatud ühendi massibilansi määramiseks kavandatud katsed teha eraldi rühmas või eraldi uuringuna kudedes jaotumise katsest, kus kõik väljaheited (mis võivad samuti hõlmata väljahingatud õhku) ja terved korjused homogeneeritakse ja neid analüsitakse vedelik-stsintillatsiooniloenduri abil.

Bioakumulatsioon – vaata „akumulatsioon“.

Biopüsivus – vt „püsivus“.

Biosaadavus – manustatud doosi osa, mis jõuab süsteemsesse ringlusse või mis on füsioloogilise aktiivsuse kohas kättesaadav. Tavaliselt viitab uuritava kemikaali biosaadavus lähteühendile, kuid see võib viidata ka lähteühendi metaboliidile. Tegemist on ainult ühe keemilise vormiga. *Tähelepanu!* Biosaadavus ei ole sama, mis imendumine. Erinevus näiteks suukaudse imendumise (s.o olemasolu soolestiku seintes ja portaalringes) ja biosaadavuse (s.o olemasolu üldises vereringes ja kudedes) vahel võib muude tegurite hulgas (10) tekkida sellest, et soolte seinad metaboliseerivad (lagundavad) kemikaali, et kemikaal liigub väljavoolustranspordiga tagasi soolevalendikku või et kemikaal metaboliseeritakse maksas enne üldisse vereringesse sattumist. Mürgise komponendi (lähteühend või metaboliit) biosaadavus on inimest ohustava riski hindamisel ülilooline näitaja (suurelt väikesele doosile ekstrapoleerimine, ühelt kokkupuuteviisilt teisele ekstrapoleerimine), mida kasutatakse välise täheldatava kahjuliku toimeta doosi või võrdlusdoosi (kasutatud doos) alusel sisemise väärtuse tuletamiseks. Maksa mõju uurimiseks suukaudsel manustamisel piisab suukaudsest imendumisest. Kõigi muude mõjude puhul peale sisenemistee mõju on biosaadavus üldiselt usaldusväärsem näitaja edasises riskihindamises kasutamiseks kui imendumine.

▼ **M4**

Biotransformatsioon – asjakohase uuritava kemikaali (tavaliselt ensüümide toimel) keemiline muundamine kehas teiseks kemikaaliks. Sünonüümne metaboliiseerimisega.

C_{\max} – kas maksimaalne (tipp)kontsentratsioon veres (plasma/seerum) pärast manustamist või maksimaalne (tipp)kontsentratsioon väljutamisel (uriinis või fekaalides) pärast manustamist.

Detoksifitseerimise teed – etapid, mis viivad mürgiste kemikaalide kehast kõrvaldamisele kas metaboliiseerimise või väljutamise teel.

Eksogeenselt – manustatud väljastpoolt organismi või süsteemi, tekkinud väljastpoolt organismi või süsteemi.

Ekstrapoleerimine – ühe või enama tundmatu väärtuse tuletamine selle alusel, mis on juba teada või mida on täheldatud.

Ensüümide parameetrid – K_m : Michaelise konstant ning V_{\max} : maksimumkiirus.

Ensüümid/isosüümid – valgud, mis toimivad keemiliste reaktsioonide katalüsaatoritena. Isosüümid on ensüümid, mis katalüüsivad samalaadseid keemilisi reaktsioone, kuid mille aminohapete järjestus on erinev.

Imendumine – protsess(id), mille kaudu kemikaal tungib kudedesse või läbi kudede. Imendumisel peetakse silmas lähteühendit ja selle kõiki metaboliite. Seda ei tohiks segi ajada biosaadavusega.

Induktsioon / ensüümi induktsioon – ensüümi süntees keskkonnastiimuli või esilekutsuva molekuli tõttu.

Jaotumine – uuritava kemikaali ja selle derivaatide hajumine organismis.

Jaotumine kudedes – uuritava kemikaali pöörduv liikumine ühest asukohast kehas teise. Jaotumist kudedes on võimalik uurida organite lahkamise, homogeenimise, põletamise ja vedelik-stsintillatsiooniloenduri abil või kvalitatiivse ja/või kvantitatiivse kogu keha autoradiograafia abil. Esimene nimetatud meetod võimaldab leida kudedes ja sama looma korjusejääkides kontsentratsiooni ning sealt taasleidmise protsendi, kuid selle eraldusvõime ei pruugi olla piisav kõigi kudede jaoks ning summaarse taasleidmise jaoks (< 90 %) ei pruugi see parim lahendus olla. Vt summaarse taasleidmise selgitus eespool.

Jaotuskoefitsient – see näitaja iseloomustab kemikaali erinevat lahustuvust kahes lahustis.

Kliirens – selle kiiruse kvantitatiivne näitaja, millega uuritav kemikaal verest, plasmas või teatavast koest ajaühiku kohta kõrvaldatakse.

Kompartiment – keha, koe või raku struktuurne või biokeemiline osa (või üksus), mis asub ülejäänust eraldi.

Küllastatus – seisund, milles üks või mitu kineetilist protsessi (näiteks imendumine, metaboliiseerimine või kliirens) on maksimumis („küllastatud“).

Lineaarsus / lineaarne kineetika – protsessi kineetika on lineaarne, kui kõik kompartmentidevahelise ülekande kiirused on võrdelised olemasoleva koguse või kontsentratsiooniga, s.o esimest järku. Sel juhul on uuritava kemikaali kliirensi ja jaotunud kogused, samuti poolestusajad, konstantsed. Saavutatud kontsentratsioonid on võrdelised annustamise määraga (kokkupuutega) ja akumulatsioon on kergemini ennustatav. Lineaarsust/mittelineaarsust on võimalik hinnata, kui võrreldakse omavahel asjakohaseid parameetreid, näiteks uuritava aine kontsentratsiooni plasmas ja plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera alust pindala (AUC) pärast erinevaid doose või pärast ühekordset ja korduvat kokkupuudet. Doosist sõltuvuse puudumine võib viidata ühendi metaboliiseerimise osalevate ensüümide küllastatusele; plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera aluse pindala (AUC) suurenemine pärast korduvat kokkupuudet, võrreldes ühekordse kokkupuutega, võib viidata metaboliiseerimise inhibeerimisele ning plasmas oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse kõvera aluse pindala (AUC) vähenemine võib viidata metaboliiseerimise induktsioonile (vt ka punkt 11).

▼ **M4**

Manustamistee (suukaudne, intravenoosne, nahakaudne, sissehingamine jne) – viitab viisile, kuidas kemikaali kehasse manustatakse (näiteks suukaudselt sündsöötmisega, suukaudselt söödaga, nahakaudselt, sissehingamise teel, intravenooselt jne).

Massibilanss – uuritava kemikaali süsteemi sisenemise ja sealst väljumise arvestus.

Materjalibilanss – vt „massibilanss“.

Metaboliidid – metaboliseerimise või metaboliseerimisprotsesside saadused.

Metaboliseerimine – sünonüümne „biotransformatsiooniga“.

Mudelite valideerimine – protsess, millega hinnatakse mudeli sobivust olema-solevate toksiko-koneetiliste andmete järjepidevaks kirjeldamiseks. Mudelid võib hinnata sel viisil, et mudeli prognoose võrreldakse statistiliselt ja visuaalselt katses saadud väärtustega ühise sõltumatu näitaja (näiteks aja) eri väärtuste juures. Hindamise ulatust tuleks mudeli kavandatava kasutusvaldkonna alusel põhjendada.

Mürgisuse (toimeviis) mehhanism / toimemehhanism (toimeviis) – toimemehhanism viitab konkreetsetele biokeemilistele mõjudele, mille kaudu tekib uuritava kemikaali mõju. Toimeviis viitab üldisematele teedele, mis põhjustavad uuritava kemikaali mürgisuse.

Poolestusaeg ($t_{1/2}$) – aeg, mille jooksul uuritava kemikaali kontsentratsioon väheneb kompartendis poole võrra. Tavaliselt peetakse silmas uuritava kemikaali kontsentratsiooni plasmas või kogust kogu kehas.

Püsivus (biopüsivus) – kemikaali pikaajaline olemasolu (bioloogilises süsteemis) lagunemisele/kõrvaldamisele vastupidavuse tõttu.

Retseptori mikroskoopne autoradiograafia (või retseptori mikroautoradiograafia) – seda meetodit võib kasutada selleks, et uurida ksenobiootikumide sidumist konkreetsete koelementide või rakupopulatsioonide poolt näiteks retseptorite sidumise või konkreetse toimeviisi uuringutes, mis võivad nõuda suurt eraldusvõimet ja suurt tundlikkust, mis ei pruugi olla saavutatavad muu meetodi, näiteks kogu keha autoradiograafia puhul.

Sapieritus – eritumine sapijuhade kaudu.

Sihtkude – kude, milles avaldub mürgise aine peamine kahjulik mõju.

Suukaudne imendumine – manustatud uuritava kemikaali doosi manustamise kohast (näiteks seedetraktist) imendumise protsent. Seda üliolulist parameetrit saab kasutada selleks, et määrata manustatud uuritava kemikaali osa, mis jõuab portaalveeni ja seejärel maksa.

Süsteemide modelleerimine (füsioloogial põhinev toksikokineetika, farmakokineetikal põhinev, füsioloogial põhinev farmakokineetika, bioloogial põhinev jne) – abstraktne mudel, milles süsteemi käitumist kirjeldatakse matemaatilisel.

T_{max} – C_{max} -i saavutamiseks vajalik aeg.

Toksikokineetika (farmakokineetika) – kemikaalide imendumise, jaotumise, metaboliseerimise ja väljutamise ajast sõltuvuse uurimine.

▼ M4

Tundlikkus – meetodi või mõõtevahendi suutlikkus eristada mõõdetavaid signaale, mis vastavad huvipakkuva muutuja erinevale sisaldusele.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Vere (plasma/seerumi) maksimaalsed tasemed – maksimaalne (tipp)kontsentratsioon veres (plasmas/seerumis) pärast manustamist (vt ka „ C_{max} ”).

Veres (plasmas) oleva kontsentratsiooni statsionaarne olek – avatud süsteemi mittetasakaaluline olek, mille puhul kõik süsteemile avalduvad mõjud on täpselt tasakaalustatud vastupidiste mõjude poolt selliselt, et kõigi selle komponentide kontsentratsioon on püsiv, kuigi ained voolavad läbi süsteemi.

Väljutamine – protsess(id), millega manustatud uuritav kemikaal ja/või selle metaboliidid kehast kõrvaldatakse.

▼B**B.37. FOSFORORGAANILISTEST AINETEST PÕHJUSTATUD VIIVISTOIMEGA NEUROTOKSILISUS PÄRAST ÄGEDAT KOKKUPUUTUMIST****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Ainete toksilise toime iseloomustamisel ja hindamisel on oluline vaadelda teatavate aineklasside potentsiaali põhjustada spetsiifilist neurotoksilisust, mida ei pruugi olla võimalik teiste toksilisuse uuringutega tuvastada. Teatavad fosfororgaanilised ained põhjustavad viivistoimega neurotoksilisust ja neid tuleks pidada võimalikeks uurimisobjektideks.

Viivistoimega polüneuropaatiat põhjustada võivate ainete tuvastamiseks tuleks kasutada *in vitro* sõelumiskatseid; *in vitro* uuringute negatiivsed leiud ei tõenda, et uuritav aine ei ole neurotoksiline.

Vt B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Fosfororgaanilised ained sisaldavad laenguta fosfororgaanilisi estreid või fosfororgaaniliste või fosfoonorgaaniliste või orgaaniliste fosforamidohapete või analoogsete fosfortio, fosfoontio või fosfortioamidohapete tioestrid või anhüdriide, mis võivad põhjustada selle aineklassi puhul täheldatavat viivistoimega neurotoksilisust.

Viivistoimega neurotoksilisus on sündroom, mis on seotud pika viivitusega ataksia, seljaaju ja perifeerse närvi distaalse aksonopaatia ilmnemisel ja närvikoes neuropaatia sihtesteraasi (NTE) takistamise ja vananemisega.

1.3. VÕRDLUSAINED

Võrdlusaineid võib uurida positiivse võrdlusrühmaga tõestamiseks, et uuritava liigi vastus ei ole laboratoorsetel katsetingimustel märkimisväärselt muutunud.

Üks näide laialdaselt kasutatud neurotoksilisest aineist on tri-o-tolüül-3-fosfaat (CASi nr 78-30-8, EINECSI nr 201-103-5, CASi nomenklatuur: fosforhape, tris(2-metüülfenüül)ester), samuti tuntud kui tris-o-kresüülfosfaat.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritav aine manustatakse suu kaudu ühekordse doosina kanadele, keda on vajaduse korral kaitstud ägedate kolinergiliste mõjude eest. Loomi vaadeldakse käitumuslike kõrvalekallete, ataksia ja paralüüsi tuvastamiseks 21 päeva. Biokeemilised mõõtmised, eelkõige neuropaatia sihtesteraasi pidurdamine (NTE), tehakse tavaliselt 24 ja 48 tundi pärast doosi andmist igast rühmast juhuslikkuse printsiibil valitud kanadel. 21 päeva pärast kokkupuudet tapetakse ülejäänud kanad ning seejärel viiakse läbi valitud närvikude histopatoloogiline uuring.

▼B

1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.5.1. **Ettevalmistused**

Noored terved täiskasvanud kanad, kellele ei esine takistavaid viirushaigusi, kellele ei manustata ravimeid ja kelle kõnnakus ei esine kõrvalekaldeid, jagatakse juhuslikkuse printsiibil katse- ja võrdlusrühmadesse ning seejärel lastakse neil vähemalt viis päeva enne uuringu algust laboritingimustega kohaneda.

Kasutada tuleks puure või piirdeaedu, mis on piisavalt suured, et kanad saaksid vabalt liikuda ja et neid saaks kergesti vaadelda.

Uuritav aine tuleks tavaliselt manustada sondi, želatiinikapslite või mõne samaväärsse meetodi abil suu kaudu. Vedelikke võib anda lahjendamata kujul või sobivas vehiikelis (nt maisiõli) lahustatuna; tahked ained tuleks võimaluse korral lahustada, kuna suured kogused ei pruugi želatiinikapslites täielikult absorbeeruda. Mitte-vesilahuseliste vehiikelite puhul peaksid olema teada vehiikeli toksilised omadused ning kui need ei ole teada, tuleks need enne katse läbiviimist kindlaks teha.

1.5.2. **Katsetingimused**1.5.2.1. *Katseloomad*

Soovitatakse kasutada noori, 8–12 kuu vanuseid täiskasvanud muna-kanu (*Gallus gallus domesticus*). Kasutada tuleks normaalsuuruses ja -aretusliini kanu ning kanad peaksid üldjuhul olema kasvatatud tingimuses, kus neil oli võimalik vabalt liikuda.

1.5.2.2. *Arv ja sugu*

Lisaks katserühmale tuleks kasutada nii võrdlusrühma, millele antakse vehiikelit, kui ka positiivset võrdlusrühma. Võrdlusrühma, millele antakse vehiikelit, tuleks käsitada samal viisil kui katserühma, välja arvatud uuritava aine manustamise osas.

Igas lindude rühmas peab olema piisav arv kanu, et biokeemiliste määramiste tegemiseks oleks võimalik tappa vähemalt kuus lindu (kolm lindu kahel eri ajahetkel) ja et kuus lindu jääksid ellu 21 päevase vaatlusperioodi ajaks patoloogiauringu läbiviimiseks.

Positiivset võrdlusrühma võib uurida samaaegselt või hilisema võrdlusrühmana. Positiivses võrdlusrühmas peaks olema vähemalt kuus kana, kellele on manustatud tuntud viivistoimega neurotoksilist ainet, kolme kana puhul tehakse biokeemiline uuring ja kolmel kanal patoloogiline uuring. Varasemaid andmeid tuleks korrapäraselt ajakohastada. Uued positiivse võrdlusrühma andmed on vajalikud siis, kui katset tegev laboratoorium on mõnda katse tegemiseks olulist elementi (aretusliin, toit, pidamistingimused) muutnud.

▼B1.5.2.3. *Annused*

Põhiuuringus kasutatav doositase tuleb määrata kindlaks eeluuringus, milles kasutatakse asjakohasel arvul kanu ja doositasemerühmasid. Selleks et määrata kindlaks piisav doos põhiuuringu jaoks, peab eeluuringus tavaliselt mõni lind surema. Vältimaks surma ägedate kolinergiliste mõjude tagajärjel, võib siiski kasutada atropiini või mõnda teist uuritavat ainet, mis teadaolevalt ei mõjuta viivistoimega neurotoksilisi reaktsioone. Uuritava aine mittesurmava maksimaalse doosi (vt meetod B.1a) määramiseks võib kasutada erinevaid uurimismeetodeid. Doosi valikul võib abi olla varasematest andmetest või muust toksikoloogilisest teabest.

Uuritava aine doositase peaks põhiuuringus olema võimalikult kõrge, võttes võimaluse korral arvesse doosivaliku eeluuringu tulemusi ja ülemist piirdoosi 2 000 mg kehakaalu kg kohta. Suremus ei tohiks olla nii suur, et see takistaks 21. päeval allesjäävate loomadega läbi viia biokeemilist uuringut (kuus katselooma) ja histoloogilist uuringut (kuus katselooma). Vältimaks surma ägedate kolinergiliste mõjude tagajärjel, võib kasutada atropiini või mõnda teist kaitseainet, mis teadaolevalt ei mõjuta viivistoimega neurotoksilisi reaktsioone.

1.5.2.4. *Piirsalduskatse*

Kui katses ei tuvastata käesolevas uuringus kirjeldatud menetlusega päevadoosil 2 000 mg kehakaalu kg kohta täheldatavat toksilist toimet ja kui toksilisus ei ole samalaadse struktuuriga ainete osas saadud andmete põhjal ootuspärane, ei loeta suurema doosiga uuringut vajalikuks. Läbi võib viia piirsalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

1.5.3. **Vaatlusperiood**

Vaatlusperiood peaks olema 21 päeva.

1.5.4. **Katse käik**

Pärast kaitseaine manustamist ägedast kolinergilisest toimest tuleneva surma vältimiseks manustatakse uuritav aine ühekordse doosina.

Üldine vaatlus

Vaatlused peaksid algama kohe pärast kokkupuudet. Kõiki kanu tuleks esimese kahe päeva jooksul mitu korda hoolikalt vaadelda ning seejärel 21 päeva jooksul või kuni kavandatud tapmiseni vähemalt kord päevas. Kõik toksilisuse märgid tuleks üles märkida, sealhulgas ilmnenise aeg, liik, raskusaste ja käitumuslike kõrvalekallete kestus. Ataksiat tuleks mõõta ordinaalse hindamisskaalaga, milles on vähemalt neli taset, ja paralüüsi esinemine tuleks registreerida. Patoloogilise uuringu jaoks välja valitud kanu tuleks vähemalt kaks korda nädalas puurist välja lasta ning neid tuleks väiksemate toksiliste mõjude hindamise hõlbustamiseks liikuma sundida (näiteks redelil ronimine). Haigestunud loomad ja loomad, kellel esineb suurt stressi või valu, eemaldatakse katsest, tapetakse humaanselt ja lahatakse.

▼B**Kehakaal**

Kõiki kanu tuleks kaaluda vahetult enne uuritava aine manustamist ning seejärel vähemalt kord nädalas.

Biokeemia

Kuus juhuslikult valitud kana igast katserühmast ja võrdlusrühmast, millele antakse vehiikelit, ja kolm kana positiivsest võrdlusrühmast (kui katse viiakse läbi samaaegselt) tuleks tappa mõne päeva jooksul pärast viimase doosi manustamist ning ajust ja nimmelülidest valmistatud valmistist hinnatakse neuropaatia sihtesteraasi (NTE) pidurdamisaktiivsuse osas. Lisaks sellele tuleks neuropaatia sihtesteraasi pidurdamisaktiivsuseks ette valmistada ja analüüsida istmikunärvi kude. Tavaliselt tapetakse 24 ja 48 tunni pärast kolm võrdlusrühma ja iga katserühma lindu ning 24 tunni pärast tuleks tappa ka kolm positiivsesse võrdlusrühma kuuluvat lindu. Kui toksilisuse kliiniliste märkide vaatlus (mida on võimalik hinnata kolinergiliste märkide ilmumise aja vaatlemisel) viitab toksilise aine eriti aeglasele kõrvaldamisele, on soovitatav võtta kahel erineval ajahetkel 24–72 tunni jooksul pärast manustamist kolmelt linnult koeproov.

Vajaduse korral võib nende proovidega teha ka atsetüülkoliinesteraasi analüüsi (AChE). AChE võib siiski spontaanselt *in vivo* reaktiveeruda ja tuua kaasa selle, et aine potentsiaali AChE inhibiitorina alahinnatakse.

Täielik lahang

Kõikide loomade (kelle tapmine oli kavatsatud ja kes olid suremas) täielik lahang peaks hõlmama aju ja seljaaju väliste tunnuste vaatlemist.

Histopatoloogiline uuring

Vaatlusperioodil ellujäänud ja biokeemilistes uuringutes kasutamata loomade närvikude tuleks mikroskoopiliselt uurida. Koed tuleks kinnitada perfusiooni abil kohapeal. Lõiked tuleks võtta väikeajust (keskmiselt pikitasandilt), piklikajust, seljaajust ja perifeersetest närvidest. Seljaaju puhul tuleb lõiked võtta ülemistest kaelalülidest, kesktorakaaalosast ja lumbosakraalosast. Tuleks võtta lõiked ka tibiaalnärvi distaalsest osast ja selle kaksiksääre-marjalihase harudest ja istmikunärvist. Lõiked tuleks katta sobivate müeliini- ja aksonispetsiifiliste ainetega.

2. ANDMED

Käesolevas meetodis valitud lõpp-punktide (biokeemia, histopatoloogia ja käitumuslik vaatlus) negatiivsed tulemused ei nõua tavapärast täiendavat uurimist viivistoimega neurotoksilisuse osas. Nendes lõpp-punktides saadud ebaselged või poolikud tulemused võivad nõuda täiendavat hindamist.

Loomade kohta tuleks esitada andmed individuaalselt. Kõik andmed tuleks esitada kokkuvõtvalt tabelis, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, vigastustega loomade arv, toime käitumisele või biokeemiline toime, kahjustuste või toime liik ja raskusaste, loomade protsent iga tüüpi vigastuste ja raskusastmete kohta.

▼B

Käesoleva uuringu tulemusi tuleks hinnata käitumuslike, biokeemiliste ja histopatoloogiliste mõjude esinemise, raskusastme ja korrelatsiooni põhjal ja katse- või võrdlusrühmas täheldatud muude mõjude suhtes.

Numbrilisi tulemusi tuleks hinnata asjakohaste ja üldiselt tunnustatud statistiliste meetoditega. Kasutatavad statistilised meetodid tuleks valida uuringu kavandamise etapis.

3. ARUANDLUS

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab võimaluse korral sisaldama järgmist teavet

3.1. Katseloomad:

- kasutatud aretusliin;
- loomade arv ja vanus;
- päritolu, pidamistingimused, toit jne;
- iga looma kaal katse alguses.

3.2. Katsetingimused:

- uuritava aine ettevalmistamise, stabiilsuse ja homogeensuse üksikasjad; vajaduse korral;
- vehiikeli valiku põhjendus;
- uuritava aine manustamise üksikasjad;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- doosi valimise põhjendused;
- manustatud dooside üksikasjad, sealhulgas andmed vehiikeli, mahu ja manustatud aine füüsilise vormi kohta;
- võimalike kaitseainete identifitseerimine ja nende manustamise üksikasjad.

3.3. Tulemused:

- kehakaalu andmed;
- toksilise reaktsiooni andmed vastavalt rühmale, sealhulgas suremus;
- kliiniliste vaatluste iseloom, raskusaste ja kestus (pöördumatu või mitte);
- biokeemiliste meetodite ja leidude üksikasjalik kirjeldus;
- lahkamise tulemused;
- histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. VIITED

Käesolev meetod on analoogne meetodiga OECD TG 418.

▼B**B.38. FOSFORORGAANILISTEST AINETEST PÕHJUSTATUD
VIIVISTOIMEGA NEUROTOKSILISUSE 28PÄEVANE
KORDUSDOOSI UURING****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Ainete toksilise toime iseloomustamisel ja hindamisel on oluline vaadelda teatavate aineklasside potentsiaali põhjustada spetsiifilist neurotoksilisust, mida ei pruugi olla võimalik teiste toksilisuse uurin-gutega tuvastada. Teatavad fosfororgaanilised ained põhjustavad viivistoimega neurotoksilisust ja neid tuleks pidada võimalikeks uuri-misobjektideks.

Nende ainete tuvastamiseks, mis võivad põhjustada viivistoimega polüneuropaatiat, tuleks kasutada *in vitro* sõelumiskatseid; *in vitro* uuringute negatiivsed leiud ei tõenda, et uuritav aine ei ole neuro-toksiline.

Käesolev 28päevane viivistoimega neurotoksilisuse katse annab teavet võimalike ohtude kohta tervisele, mis võivad tõenäoliselt tule-neda korduvatest kokkupuudetest piiratud ajavahemiku jooksul. Nimetatud uuringuga saab teavet doosireaktsiooni kohta ning selle abil on võimalik hinnata täheldatava kahjuliku toimeta doosi taset, mis aitaks määrata kokkupuute ohutuskriteeriumeid.

Vt samuti B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Fosfororgaanilised ained sisaldavad laenguta fosfororgaanilisi estreid või fosfororgaaniliste või fosfoonorgaaniliste või orgaaniliste fosfo-ramidohapete või analoogsete fosfortio, fosfoontio või fosfortioami-dohapete tioestreid või anhütriide, mis võivad põhjustada selle aine-klassi puhul täheldatavat viivistoimega neurotoksilisust.

Viivistoimega neurotoksilisus on sündroom, mis on seotud pika viivitusega ataksia, seljaaju ja perifeerse närvi distaalse aksonopaatia ilmnemisel ja närvikoos neuropaatia sihtteraasi (NTE) takistamise ja vananemisega.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritava aine päevaseid doose manustatakse kanadele suu kaudu 28 päeva jooksul. Loomi vaadeldakse vähemalt kord päevas käitumus-like kõrvalekallete, ataksia ja paralüüsi tuvastamiseks 14 päeva jooksul pärast viimase doosi manustamist. Biokeemilised mõõtmised, eelkõige neuropaatia sihtteraasi pidurdamine (NTE), tehakse igast rühmast juhuslikkuse printsiibil valitud kanadel tavaliselt 24 ja 48 tundi pärast viimase doosi andmist. Kaks nädalat pärast kokkupuudet tapetakse ülejäänud kanad ning viiakse läbi valitud närvikudede histopatoloogiline uuring.

▼B

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Ettevalmistused**

Noortel tervetel täiskasvanud kanadel, kellel ei esine takistavaid viirushaigusi, kellele ei manustata ravimeid ja kelle kõnnakus ei esine kõrvalekaldeid, jagatakse juhuslikkuse põhimõtte alusel katse- ja võrdlusrühmadesse ning seejärel lastakse neil vähemalt viis päeva enne uuringu algust laboritingimustega kohaneda.

Kasutada tuleks puure või piirdeaedu, mis on piisavalt suured, võimaldades kanadel vabalt liikuda ja neid kergesti vaadelda.

Doosid tuleks manustada suu kaudu seitsmel päeval nädalas ning eelistatult sondi või želatiinikapslite abil. Vedelikke võib anda lahjendamata kujul või sobivas vehiikelis (nt maisiõli) lahustatuna; tahked ained tuleks võimaluse korral lahustada, kuna suured kogused ei pruugi želatiinikapslites täielikult absorbeeruda. Mitte-vesilahuseliste vehiikelite puhul peaksid olema teada vehiikeli toksilised omadused ning kui need ei ole teada, tuleks need enne katse läbiviimist kindlaks teha.

1.4.2. **Katsetingimused**1.4.2.1. *Katseloomad*

Soovitatakse kasutada noori, 8–12 kuu vanuseid täiskasvanud munakanu (*Gallus gallus domesticus*). Kasutada tuleks normaalsuuruses ja -aretusliini kanu ning kanad peaksid üldjuhul olema kasvatatud tingimuses, kus neil oli võimalik vabalt liikuda.

1.4.2.2. *Arv ja sugu*

Üldiselt tuleks kasutada kolme katserühma ja ühte vehiikeli võrdlusrühma. Võrdlusrühma, millele antakse vehiikelit, tuleks käsitada samal viisil kui katserühma, välja arvatud uuritava aine manustamise osas.

Igas lindude rühmas peab olema piisav arv kanu selleks, et biokeemiliste määramiste tegemiseks oleks võimalik tappa vähemalt kuus lindu (kolm lindu kahel eri ajahetkel) ja et kuus lindu jääksid ellu 14päevase vaatlusperioodi ajaks patoloogiauringu tegemiseks.

1.4.2.3. *Annused*

Annuste valimisel tuleks arvesse võtta kolme viivistoimega neurotoksilisuse ägeda toksilisuse katse tulemusi ja teisi uuritava ühendi toksilisi või kineetilisi andmeid. Tuleks valida kõrgeim doositase, mille eesmärgiks oleks toksilise toime esilekutsumine, eelistatult viivistoimega neurotoksilisus, kuid vältida tuleks doositaset, mis kutsub esile surma või tõsised kannatused. Seejärel tuleks valida aste-astmelt vähenevad doositasemed doosist tuleneva reaktsiooni ja madalaimal doositasemel täheldatava kahjuliku toimeta doosi (NOAEL) demonstreerimiseks.

▼B1.4.2.4. *Piirsalduskatse*

Kui katses ei tuvastata käesolevas uuringus kirjeldatud menetlusega päevadoosil 1 000 mg kehakaalu kg kohta täheldatavat toksilist toimet ja kui toksilisus ei ole samalaadse struktuuriga ainete osas saadud andmete põhjal ootuspärane, ei loeta suurema doosiga uuringut vajalikuks. Teha võib piirsalduskatse, välja arvatud juhul, kui inimese eeldatav kokkupuude viitab vajadusele kasutada suuremat doositaset.

1.4.2.5. *Vaatlusperiood*

Kõiki loomi tuleks kokkupuuteperioodi ajal vaadelda vähemalt kord päevas ja pärast seda 14 päeva jooksul kuni kavandatava lahkamiseni.

1.4.3. **Katse käik**

Loomadele doseeritakse uuritavat ainet seitsmel päeval nädalas ja 28 päeva jooksul.

Üldised märkused

Vaatlused peaksid algama kohe pärast katse algust. Kõiki kanu tuleks põhjalikult vaadelda 28päevase katseaja jooksul vähemalt kord päevas ja seejärel 14 päeva jooksul pärast manustamist või kuni kavandatava tapmiseni. Kõik toksilisuse märgid tuleks üles märkida, sealhulgas ilmnemise aeg, liik, raskusaste ja kestus. Vaatluste käigus tuleks vaadelda lisaks muule kõrvalekaldeid käitumises. Ataksiat tuleks mõõta ordinaalse hindamisskaalaga, milles on vähemalt neli taset ja paralüüsi esinemine tuleks registreerida. Kanad tuleks vähemalt kaks korda nädalas puurist välja lasta ning neid tuleks väiksemate toksiliste mõjude hindamiseks hõlbustamiseks liikuma sundida (näiteks redelil ronimine). Haigestunud loomad, kellel esineb suurt stressi või valu, eemaldatakse katsest, tapetakse humaanselt ja lahatakse.

Kehakaal

Kõiki kanu tuleks kaaluda vahetult enne uuritava aine esmakordset manustamist ning seejärel iga nädala järel.

Biokeemia

Kuus juhulikult valitud kana igast katserühmast ja võrdlusrühmast, millele antakse vehiikelit, tuleks tappa mõne päeva jooksul pärast viimase doosi manustamist ning ajust ja nimmelülidest valmistatud valmistist hinnatakse neuropaatia sihtesteraasi (NTE) pidurdamisaktiivsuse osas. Lisaks sellele tuleks ette valmistada ja analüüsida istmikunärvi kude neuropaatia sihtesteraasi (NTE) pidurdamisaktiivsuse osas. Tavaliselt tapetakse kolm võrdlusrühma ja katserühma kuuluvat lindu 24 tunni pärast ja kolm lindu pärast viimase doosi manustamist. Kui ägeda toksilisuse uuringute või muude uuringute (nt toksikokineetika) andmed osutavad sellele, et loomade tapmine peaks toimuma muul ajal kui pärast viimase doosi andmist, tuleks neid aegu järgida ning põhjendused dokumenteerida.

Vajaduse korral võib nende proovidega läbi viia ka atsetüülkoliinesteraasi analüüsi (AChE). AChE võib siiski spontaanselt in vivo reaktiveeruda ja tuua kaasa selle, et aine potentsiaali AChE inhibiitorina alahinnatakse.

▼B*Täielik lahang*

Kõikide loomade (kelle tapmine oli kavatsatud ja kes olid suremas) täielik lahang peaks hõlmama aju ja seljaaju väliste tunnuste vaatlemist.

Histopatoloogiline uuring

Vaatlusperioodil ellujäänud ja biokeemilistes uuringutes kasutamata loomade närvikude tuleks mikroskoopiliselt uurida. Koed tuleks kinnitada kohapeal perfusiooni abil. Lõiked tuleks võtta väikeajust (keskmiselt pikitasandilt), piklikajust, seljaajust ja perifeersetest närvidest. Seljaaju puhul tuleb lõiked võtta ülemistest kaelalülidest, kesktorakaalosalast ja lumbosakraalosalast. Tuleks võtta lõiked ka tibialnärvi distaalsest osast ja selle kaksiksääre-marjalihase harudest ja istmikunärvist. Lõiked tuleks katta sobivate müeliini- ja aksonipetsiifiliste ainetega. Alguses tuleks kõikide võrdlusrühma ja kõrge doosiga rühmade loomade säilitatud kudesid mikroskoopiliselt uurida. Kui kõrge doosiga rühmade puhul on toime kohta tõendid olemas, tuleks mikroskoopiline uuring viia läbi ka keskmise ja madala doosiga rühmade puhul.

2. ANDMED

Käesolevas meetodis valitud lõpp-punktide (biokeemia, histopatoloogia ja käitumuslik vaatlus) negatiivsed tulemused ei nõua tavapärast täiendavat uurimist viivistoimega neurotoksilisuse osas. Nendes lõpp-punktides saadud ebaselged või poolikud tulemused võivad nõuda täiendavat hindamist.

Loomade kohta tuleks esitada andmed individuaalselt. Kõik andmed tuleks esitada kokkuvõtvalt tabelis, milles oleks iga katserühma kohta märgitud loomade arv katse alguses, vigastustega loomade arv, toime käitumisele või biokeemiline toime, kahjustuste või toime liik ja raskusaste, loomade protsent iga tüüpi vigastuste ja raskusastmete kohta.

Käesoleva uuringu tulemusi tuleks hinnata käitumuslike, biokeemiliste ja histopatoloogiliste mõjude esinemise, raskusastme ja korrelatsiooni põhjal ja katse või võrdlusrühmas täheldatud muude mõjude suhtes.

Numbrilisi tulemusi tuleks hinnata asjakohaste ja üldiselt tunnustatud statistiliste meetoditega. Statistilised meetodid tuleks valida uuringu kavandamise etapis.

3. ARUANDLUS**KATSEARUANNE**

Katsearuanne peab võimaluse korral sisaldama järgmist teavet.

Katseloomad:

- kasutatud aretusliin;
- loomade arv ja vanus;
- päritolu, pidamistingimused, toit jne;
- iga looma kaal katse alguses.

▼B

Katsetingimused:

- uuritava aine ettevalmistamise, stabiilsuse ja homogeensuse üksikasjad, kui see on asjakohane;
- vehiikeli valiku põhjendus;
- uuritava aine manustamise üksikasjad;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- doosi valimise põhjendused;
- manustatud dooside üksikasjad, sealhulgas andmed vehiikeli, mahu ja manustatud aine füüsilise vormi kohta;
- teiste biokeemiliste määramiste aegade valimise põhjendus, kui selleks ei ole 24 või 48 tundi.

Tulemused:

- kehakaalu andmed;
- toksilise reaktsiooni andmed vastavalt doositasemele, sealhulgas suremus;
- täheldatava kahjuliku toimeta doos;
- kliiniliste vaatluste iseloom, raskusaste ja kestus (pöördumatu või mitte);
- biokeemiliste meetodite ja leidude üksikasjalik kirjeldus;
- lahkamise tulemused;
- histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine.

Tulemuste üle arutlemine.

Järeldused.

4. VIITED

Käesolev meetod on analoogne meetodiga OECD TG 419.

▼B**B.39. PLAANIVÄLISE DNA SÜNTEESI (UDS) KATSE IMETAJATE MAKSARAKKUDEGA *IN VIVO*****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 486, Unscheduled DNA Synthesis (UDS) Test with Mammalian Liver Cells *In Vivo* (1997).

1.1. SISSEJUHATUS

Plaanivälise DNA sünteesi (UDS) katse imetajate maksarakkudega *in vivo* eesmärk on identifitseerida katseained, mis põhjustavad DNA parandust katseloomade maksarakkudes (1, 2, 3, 4).

Käesolev *in vivo* katse on meetod keemiliste ainete genotoksiliste mõjude uurimiseks maksas. Mõõdetud lõpp-punkt ilmneb DNA kahjustuses ja selle hilisemas parandamises maksarakkudes. Maks on tavaliselt imendunud ühendite ainevahetuse peamine koht. See on seega sobiv koht DNA kahjustuse mõõtmiseks *in vivo*.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritav aine ei pääse sihtkoosse, siis ei ole vaja kasutada käesolevat katset.

Plaanivälise DNA sünteesi (UDS) lõpp-punkt mõõdetakse määrares märgistatud nukleosiidide ühinemist S-faasi DNA sünteesi väliste rakkudega. Enimkasutatav meetod on tritiumiga märgistatud tümiidiini (³H-TdR) ühinemise määramine autoradiograafiliselt. *In vivo* UDS-katsetes kasutatakse eelistatult rotimaksasid. Võib kasutada ka muid kudesid peale maksa, kuid neid ei kirjeldata käesolevas meetodis.

UDS-vastuse avastamine sõltub väljalõigatud ja asendatud DNA aluste arvust kahjustuse kohas. Seega on UDS-katse eriti väärtuslik ainetest põhjustatud „pikkade DNA osade paranduse” (*longpatch repair*) avastamiseks (20–30 alust). „Lühikeste osade parandus” (*shortpatch repair*) (1–3 alust) avastatakse palju väiksema tundlikkusega. Lisaks võivad mutageensed muutused aset leida DNA kahjustuste parandamata jätmisel, parandamisvigade või replikatsioonivigade tegemisel. UDS-vastuse ulatus ei viita parandusprotsessi usaldusväärsusele. Lisaks on võimalik, et mutageen reageerib DNAGA, aga DNA kahjustust ei parandata lõikamis-parandamisprotsessi kaudu. Kuna lõpp-punkt mõõdetakse kogu genoomist, siis potentsiaalne tundlikkus korvab selle, et UDS-katse ei anna spetsiifilist teavet mutageense aktiivsuse kohta.

Vt ka B osa üldist sissejuhatust.

1.2. MÕISTED

Parandatavad rakud – osakeste netoarv tuumas ehk NNG-väärtus on suurem kui arvestuslik väärtus, mida on põhjendatud katset tegevas laboris.

NNG-väärtus (*net nuclear grains*) – rakkude UDS-aktiivsuse kvantitatiivne mõõtmine autoradiograafilistes UDS-katsetes, arvatuna tuumale vastavatel tsütoplasma aladel (CG) tsütoplasma osakeste keskmise arvu mahaarvamisel tuumaosakeste arvust (NG): NNG = NG – CG. NNG-arvud arvutatakse üksikute rakkude kohta ja seejärel pannakse rakud kultuuris, paralleelsetes kultuurides jm kokku.

▼B

Plaaniväline DNA sünteis (UDS) – DNA parandussünteis pärast seda, kui keemiliste ainete või füüsikaliste mõjurite põhjustatud kahjustuse alal sisalduva DNA osa on lahti lõigatud ja eemaldatud kromosoomist.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

UDS-katse imetajate maksarakkudega *in vivo* viitab DNA parandussünteisele pärast seda, kui keemiliste ainete või füüsikaliste mõjurite põhjustatud kahjustuse alal sisalduva DNA osa on lahti lõigatud ja eemaldatud kromosoomist. Katse põhineb enamasti ³H-TdR lisamisel maksarakkude DNA-sse, millel on üksnes väike rakutsükli S-faasis olevate rakkude esinemissagedus. ³H-TdR lisamine määratakse tavaliselt autoradiograafiliselt, kuna kõnealune tehnika ei ole vastuvõtlik S-faasis olevatele rakkudele, nagu nt vedeliksintsiillatsiooniloendus.

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1. **Preparaadid**1.4.1.1. *Loomaliikide valik*

Tavaliselt kasutatakse rotte, kuigi võib kasutada mis tahes sobivaid imetajate liike. Rakendatakse noorte tervete loomade enimkasutatavaid laboritüvesid. Uuringut alustades peaks loomade kaalumuutus olema minimaalne ja ei tohiks ületada ± 20 % iga soo keskmisest kaalust.

1.4.1.2. *Elamis- ja söötmingimused*

Üldise sissejuhatuse B osas toodud üldtingimusi kohaldatakse, kuigi niiskuse eesmärk peaks olema 50–60 %.

1.4.1.3. *Loomade ettevalmistamine*

Terved noored täiskasvanud loomad määratakse juhuvälise alusel kontroll- ja katserühma. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomad identifitseeritakse individuaalselt ja hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne uurimise alustamist, et võimaldada labori tingimustega kohanemist.

1.4.1.4. *Uuritav aine/preparaat*

Tahked uuritavad ained tuleb lahustada või suspendeerida sobivates lahustites või kandjaainetes ja vajadusel lahjendada enne loomadele andmist. Vedelaid uuritavaid aineid võib doseerida vahetult või lahjendatakse enne doseerimist. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

1.4.2. **Katsetingimused**1.4.2.1. *Lahusti/kandjaaine*

Lahusti/kandjaaine ei tohi avaldada toksilist mõju kasutatavate annuste korral ja ei tohi astuda keemilise reaktsiooni uuritava ainega. Kui kasutatakse muud kui tuntud lahustit/kandjaainet, peab nende kasutamine toetuma ühtesobivuse kohta käivatele andmetele. Soovitav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahustite/-kandjaainete kasutamist.

▼ B1.4.2.2. *Kontrollid*

Igasse sõltumatult läbiviidud katseossa kaasatakse paralleelsed positiivsed ja negatiivsed (lahusti/kandjaaine) kontrollid. Kontrollrühma loomi käsitletakse sarnaselt katserühma loomadega, kuid neid ei töödelda uuritava ainega.

Positiivsed kontrollid peaksid olema ained, mis teatavasti põhjustavad UDS-i, kui neid antakse annustena, mis ootuspäraselt põhjustavad avastatavat suurenemist taustaga võrreldes. Metaboolset aktiveerimist vajavaid positiivseid kontrolle tuleks kasutada annustena, mis annavad mõõduka vastuse (4). Annused valitakse nii, et mõjud on selged, kuid need ei paljasta lugejale koheselt kodeeritud objektiklaaside identiteeti. Positiivsete kontrollainete näited:

Proovivõtuaeg	Aine	CASi nr	EINECSi nr
Varane proovivõtuaeg (2–4 tundi)	Dimetüülnitrosoamiin	62-75-9	200-249-8
Hiline proovivõtuaeg (12–16 tundi)	N-2-atsetamiidfluor (2-AAF)	53-96-3	200-188-6

Võidakse kasutada muid sobivaid positiivseid kontrollaineid. Positiivseid kontrollaineid võib manustada uuritavast ainest erineva manustamistee kaudu.

1.5. MENETLUS

1.5.1. **Loomade arv ja sugu**

Katseloomade arv peaks olema piisav katsevastuses loodusliku bioloogilise varieerumise arvessevõtmiseks. Analüüsitavaid loomi peaks olema vähemalt kolm rühma kohta. Kui märkimisväärne andmebaas on kogutud juba varem, paralleelsete negatiivsete või positiivsete kontrollrühmade jaoks on vaja üksnes üks või kaks looma.

Üksnes üht sugupoolt, eelistatult isasloomasid, võidakse kasutada, kui uurimuse ajal on kättesaadavad tulemused samas liigis ja sama vastuvõtlikkuse liini kasutades tehtud uurimuste kohta, mille tulemused näitavad, et toksilisuse osas ei ole märkimisväärseid erinevusi sugupoolte vahel. Kui inimese vastuvõtlikkus kemikaalidele on soospetsiifiline, nagu näiteks mõnede ravimite puhul, tehakse katse sobivast soost loomadega.

1.5.2. **Manustamiskava**

Uuritavaid ained tuleb üldiselt anda ühekordse annusena.

1.5.3. **Annused**

Normaalselt kasutatakse vähemalt kaht erinevat annust. Suurim annus määratletakse annusena, mis põhjustab sarnaseid mürgisuse nähte, et samale manustamiskavale põhinevate suuremate annuste puhul võib tulemuseks olla surm. Üldiselt peaksid väiksemad annused olema 50–25 % suurest annusest.

▼B

Ained, millel on spetsiifilised bioloogilised mõjud väikeste mittetoksiliste annustena (nt hormoonid ja mitogeenid), võivad olla erandiks annuse määramise kriteeriumidele ja neid tuleks hinnata iga üksiku juhtumi puhul eraldi. Kui tehakse annuse määramiseks uurimus sobivate andmete puudumisel, siis tehakse uurimus samas laboris, kasutades samu liike, tüvesid, sugu ja manustamiskava, mida kasutatakse põhiuurimuses.

Suurim annus võidakse samuti määratleda annusena, mis viitab toksilisusele maksas (nt püknootiline tuum).

1.5.4. Piirsalduskatse

Kui katse ühe annusega, milleks on vähemalt 2 000 mg/kg kehakaalu kohta päevas ja mida manustatakse ühekordse annusena või kahe annusena samal päeval, ei põhjusta täheldatavaid toksilisi mõjusid ja kui genotoksilisus ootuspäraselt põhineb struktuurselt seotud ainete andmetel, siis ei peeta kolme annuse taset käsitlevat täielikku uurimust vajalikuks. Inimeste ootuspärane vastuvõtlikkus võib viidata piirkatse kasutatavatest annustest suuremate annuste kasutamise vajadusele.

1.5.5. Manustamine

Uuritavat ainet manustatakse tavaliselt söögitoru kaudu või sobiva intubeerimise kanüüli abil. Samuti võib muid manustamismeid kasutada, kui need on põhjendatud. Kõhukelmesisest teed siiski ei soovitata, kuna maks on sel juhul uuritavale ainele vahetult vastuvõtlikum kui vereringe kaudu. Vedeliku suurim kogus, mida saab söögitoru kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusel. Kogus ei tohiks ületada 2 ml/100 g kehakaalu kohta. Suurimate koguste kasutamine peab olema põhjendatud. Arvesse võtmata ärritavaid või söövitavaid aineid, mille mõjud tavaliselt halvenevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katsekoguse varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks.

1.5.6. Maksarakkude preparaadid

Maksarakud prepeareeritakse uuritavat ainet saanud loomadelt tavaliselt 12–16 tundi pärast annustamist. Täiendav varasem proovivõtuaeg (tavaliselt kaks kuni neli tundi manustamisjärgsel) on üldiselt vajalik, välja arvatud juhul, kui on saadud selge positiivne vastus 12–16 tunni jooksul. Muid proovivõtuaegasid võib kasutada, kui need on põhjendatud toksokineetiliste andmete põhjal.

Imetajate maksarakkude lühiajalised kultuurid tehakse tavaliselt selleks, et perforeerida maksa kollagenaa-siga in situ ja võimaldada värskelt eraldunud maksarakkudel end kinnitada sobivale pinnasele. Negatiivsetelt kontrollloomadelt pärit maksarakkudel peaks olema elujõulisus (5) vähemalt 50 %.

1.5.7. UDS-määramine

Värskelt isoleeritud imetajate maksarakud inkubeeritakse tavaliselt keskkonnas, mis sisaldab ³H-TdR-i, sobiva pikkusega aja jooksul, nt kolm kuni kaheksa tundi. Inkubatsiooniperioodi lõpus tuleks sööde eraldada rakkudest, mida võidakse seejärel inkubeerida söötmes, mis sisaldab liiga palju mürgistamata tümidiini inkorporeerimata radioaktiivsuse vähendamiseks (*cold chase*). Seejärel rakud loputatakse, fikseeritakse ja kuivatatakse. Pikema inkubatsiooniaja jooksul ei pruugi mürgistamata tümidiiniga töötlemine olla vajalik. Objektiklaasid kastetakse autoradiograafilise emulsiooni sisse, valgustatakse pimedas (säilitatakse külmkapis 7–14 päeva), ilmutatakse, värvitakse ning arvutatakse valgustatud hõbeosakesed. Kaks kuni kolm objektiklaasi valmistatakse iga looma kohta.

▼B1.5.8. **Analüüs**

Objektiklaasi preparaadid peaksid sisaldama piisavalt rakke, mille morfoloogia on normaalne, milles võimaldatakse teha UDSi tähendusrikast hindamist. Preparaate uuritakse mikroskoopiliselt ilmsete tsütotoksiliste tunnuste suhtes (nt püknoos, radiomärgistuse vähene-mine).

Objektiklaasid kodeeritakse enne osakeste kokkulugemist. Tavaliselt igast loomast loetletakse 100 rakku vähemalt kahelt objektiklaasilt. Vähem kui 100 rakku/loom loendamine peab olema põhjendatud. Osakeste arvu ei arvutata S-faasis olevast tuumast, kuid S-faasi rakkude osa registreeritakse.

Morfoloogiliselt normaalsete rakkude tuuma ja tsütoplasmasse inkorporeeritud ³H-TdR hulk, mida nähakse hõbeosakeste sadestumisel, määratakse sobivate meetodite abil.

2. **ANDMED**2.1. **TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Tuleb esitada individuaalsed objektiklaasi ja loomade andmed. Lisaks esitatakse kokkuvõtte kõikidest tulemustest tabeli kujul. NNG-arvud arvutatakse iga raku, iga looma, iga annuse ja aja kohta CG-arvude mahaarvamisel NG-arvudest. Kui arvutatakse „parandatavate rakkude” arvu, peaks „parandatavate rakkude” määramine olema põhjendatud ja põhinema varasemate ja paralleelsete negatiivsete kontrollide andmetel. Numbrilisi tulemusi hinnatakse statistiliste meetodite abil. Kui statistilisi katseid kasutatakse, valitakse ja põhjendatakse neid enne uurimuse läbiviimist.

2.2. **TULEMUSTE HINDAMINE JA TÖLGENDAMINE**

Positiivsete/negatiivsete vastuste kriteeriumide näited hõlmavad:

- | | | |
|------------|-----|--|
| positiivne | i) | NNG-väärtused on suuremad kui arvestuslik lävi, mis on õigustatud varasemate laboriandmete põhjal; |
| või | ii) | NNG väärtused on oluliselt suuremad kui paralleelsetes kontrollkatsetes; |
| negatiivne | i) | NNG väärtused on varasema kontroll-läve piires või sellest väiksemad; |
| või | ii) | NNG väärtused ei ole oluliselt suuremad kui paralleelsetes kontrollkatsetes. |

▼B

Tulemuste bioloogilist olulisust arutatakse: nt loomade väliste varieerumiste, doosi ja toime suhte ja tsütotoksilisuse parameetreid tuleks arvesse võtta. Statistilisi meetodeid võidakse kasutada abivahendina katsetulemuste hindamisel. Statistiline olulisus ei saa olla ainus määrav tegur positiivse vastuse saamiseks.

Kuigi enamikul katsetest on selged positiivsed või negatiivsed tulemused, välistavad saadud tulemused harvadel juhtudel kindlate otsuste tegemise uuritava aine aktiivsuse kohta. Tulemused jäävad ebaselgeks või küsitavaks tehtud katsete kordamisest sõltumata.

UDS-katse imetajate maksarakkudega *in vivo* positiivne tulemus viitab sellele, et uuritav aine põhjustab DNA kahjustuse imetajate maksarakkudes *in vivo*, mida saab parandada plaanivälise DNA sünteesi *in vitro* abil. Negatiivne tulemus viitab sellele, et uuritav aine ei põhjusta katsetingimustes DNA kahjustust, mis oleks käesolevas katses avastatav.

Tõenäosust, et uuritav aine jõuab üldisesse vereringesse või eriti sihtkoesse (nt süsteemne toksilisus), tuleks arutada.

3. ARUANDLUS

KATSEARUANNE

Katsearuanne sisaldab järgmisi andmeid.

Kandjaaine:

- kandjaaine valiku põhjendamine;
- uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandjaaines, kui on teada.

Katseloomad:

- kasutatud liigid/tüved;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, elamistingimused, toitumine jne;
- loomade individuaalne kaal katse alustamisel, sh kehakaalu vahemik, keskväärtus ja standardhälve iga rühma kohta;

Katsetingimused:

- positiivsed ja negatiivsed (kandjaaine/lahus) kontrollid;
- annuse määramise katse tulemused, kui need on läbi viidud;
- annuste valiku põhimõtted;
- uuritava aine ettevalmistamise üksikasjad;
- uuritava aine manustamise üksikasjad;
- manustamistee;
- meetodid, mis kinnitavad, et uuritav aine jõuab üldvereringesse või sihtkoesse, vajaduse korral;

▼B

- toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) muutmine tegelikuks annuseks (mg/kg kehakaalu kohta päevas), vajaduse korral;
- üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta;
- manustamis- ja proovivõtukavade detailne kirjeldus;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- maksarakkude preparaate ja kultuuride valmistamise meetod;
- kasutatud autoradiograafiline tehnika;
- prepareeritud objektiklaaside arv ja loendatud rakkude arv;
- hindamiskriteeriumid;
- kriteeriumid, mille alusel uurimusi liigitatakse positiivseteks, negatiivseteks või ebaselgeteks.

Tulemused:

- tuumas olevate osakeste, tsütoplasmas olevate osakeste ja osakeste koguarvu tuumas keskvaartused üksikute objektiklaaside, loomade ja rühma kohta;
- doosi ja toime suhe, võimaluse korral;
- võimalikud statistilised analüüsid;
- toksilisuse tunnused;
- paralleelsete negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollide tulemused;
- varasemate negatiivsete (lahusti/kandjaaine) ja positiivsete kontrollide andmed, sh vahemikud, keskvaartused ja standardhälbed;
- „parandavate rakkude” arv, kui see on määratud;
- S-faasi rakkude arv, kui see on määratud;
- rakkude elujõulisus.

Tulemuste arutelu.

Järeldused

4.

VIITED

- (1) 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, pp. 1-18.
- (2) Butterworth, B. E., Ashby, J., Bermudez, E., Casciano, D., Mirsalis, J., Probst, G. and Williams, G. (1987), A Protocol and Guide for the In Vivo Rat Hepatocyte DNA Repair Assay, *Mutation Res.*, 189, pp. 123-133.
- (3) Kennelly, J. C, Waters, R., Ashby, J., Lefevre, P. A., Burlinson, B., Benford, D. J., Dean, S. W. and Mitchell, I. de G. (1993), In Vivo Rat Liver UDS Assay, in: Kirkland D. J. and Fox M., (eds), *Supplementary Mutagenicity Tests: UKEM Recommended Procedures. UKEMS Subcommittee on Guidelines for Mutagenicity Testing. Report. Part II revised*, Cambridge University Press, Cambridge, New York, Port Chester, Melbourne, Sydney, pp. 52-77.

▼B

- (4) Madle, S., Dean, S. W., Andrac, U., Brambilla, G., Burlinson, B., Doolittle, D. J., Furihata, C., Hertner, T., McQueen, C. A. and Mori, H. (1993), Recommendations for the Performance of UDS Tests In Vitro and In Vivo, *Mutation Res.*, 312, pp. 263-285.
- (5) Fautz, R., Hussain, B., Efstathiou, E. and Hechenberger-Freudl, C. (1993), Assessment of the Relation Between the Initial Viability and the Attachment of Freshly Isolated Rat Hepatocytes Used for the In Vivo/In Vitro DNA Repair Assay (UDS), *Mutation Res.*, 291, pp. 21-27.
- (6) Mirsalis, J. C., Tyson, C. K. and Butterworth, B. E. (1982), Detection of Genotoxic Carcinogens in the In Vivo/In Vitro Hepalocyte DNA Repair Assay, *Environ. Mutagen*, 4, pp. 553-562.

▼B**B.40. NAHASÖÖVITUSKATSE *IN VITRO*: TRANSKUTAANSE ELEKTRITAKISTUSE (TER) MÕÖTMINE****1. MEETOD**

Käesolev katsemeetod vastab suunisele OECD TG 430 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Nahasöövitus tähendab pöördumatu koekahjustuse tekitamist nahas uuritava ainega (vastavalt keemiliste ainete ja segude liigitamise ja märgistamise ülemaailmselt harmoneeritud süsteemi (GHS) määratlusele) (1). Käesoleva meetodi puhul ei kasutata söövitava toime hindamiseks elusloomi.

Nahka söövitava toime hindamisel on tavaliselt kasutatud laboriloomi (2). Kuna selline määramine põhjustas loomadele valu ja kannatusi, töötati välja katsemeetodi B.4 uus versioon, mille kohaselt on nahka söövitavat toimet võimalik hinnata alternatiivsete *in vitro* meetoditega, vältides valu ja kannatusi.

Esimene samm muude katsete määratlemisel, mida saaks kasutada nahka söövitava toime uurimiseks õigusliku reguleerimise eesmärgil, oli eelvalideerimisuuring (3). Seejärel viidi läbi nahasöövituse hindamise *in vitro* meetodite (4 ja 5) vormikohane valideerimine (6, 7 ja 8). Kõnealuste uuringute ja muude kirjandusandmete alusel soovitatakse *in vivo* nahka söövitava toime määramiseks kasutada järgmisi katseid (9, 10 ja 11): katse inimnahka mudeliga (vt katsemeetod B.40a) ja transkutaanse elektritakistuse mõõtmine (käesolev meetod).

Valideerimisuuring ja muud avaldatud uuringud on näidanud, et rotinaha transkutaanse elektritakistuse (TER) mõõtmisega (12 ja 13) saab usaldusväärselt eristada teadaolevaid nahka söövitavaid ja mittesöövitavaid aineid (5 ja 9).

Käesolevas metoodikas kirjeldatud katse võimaldab kindlaks teha söövitavad keemilised ained ja segud. Samuti võimaldab see kindlaks määrata mittesöövitavad ained ja segud, kui seejuures arvestatakse ka muid kaalukaid tõendeid (nt pH, struktuuri-aktiivsuse seos, inim-ja/või loomkatsete andmed) (1, 2, 11 ja 14). Katse ei anna teavet nahaärrituse kohta, samuti ei võimalda see söövitavate ainete liigitamist ülemaailmselt harmoneeritud liigitus süsteemi (GHS) (1) lubatavuskriteeriumide alusel alamkategoriasse.

Lokaalse nahatoime põhjalikuks hindamiseks pärast naha ühekordset kokkupuudet ainega on soovitatav järgida järjestikuste katsete strateegiat, mis on esitatud katsemeetodi B.4 (2) lisas ja ülemaailmselt harmoneeritud süsteemis (1). Nimetatud katsestrateegia näeb ette *in vitro* katsete läbiviimise nahasöövituse (nagu kirjeldatud käesolevas meetodis) ja nahaärrituse uurimiseks, enne kui hakatakse kaaluma katsete läbiviimist elusloomadega.

▼B

1.2. MÕISTED

Nahasöövitus *in vivo* – pöördumatu kahjustuse tekitamine nahas: läbi epidermise pärisnahka (dermasse) ulatuv nähtav nekroos, mis tekib kuni neljatunnisel kokkupuutel katseainega. Söövitusreaktsioonide tüüpilised avaldumisvormid on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14päevase vaatlusperioodi lõpuks värvimuutus naha valastumise tõttu, täielikult karvavabad alad ja armid. Küsitavate kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogilisi uuringuid.

Transkutaanne elektritakistus (TER) – naha elektrilise impedantsi mõõt, takistuse väärtus väljendatuna kilo-oomides. Lihtne ja töökindel meetod kaitsefunktsiooni hindamiseks, salvestades Wheatsone'i silla abil nahka läbivadioonivood.

1.3. VÕRDLUSAINED

Tabel 1

Etalonkemikaalid

Nimetus	EINECSi number	CASi nr	
1,2-diaminopropan	201-155-9	78-90-0	tugevalt söövitav
akrüülhape	201-177-9	79-10-7	tugevalt söövitav
2-tert-butüülfenool	201-807-2	88-18-6	söövitav
kaaliumhüdrosiid (10 %)	215-181-3	1310-58-3	söövitav
väävelhape (10 %)	231-639-5	7664-93-9	söövitav
oktaanhape (kaprüülhape)	204-677-5	124-07-02	söövitav
4-amino-1,2,4-triasool	209-533-5	584-13-4	mittesöövitav
eugenool	202-589-1	97-53-0	mittesöövitav
fenetüülbromiid	203-130-8	103-63-9	mittesöövitav
tetrakloroetüleen	204-825-9	27-18-4	mittesöövitav
isosteariinhape	250-178-0	30399-84-9	mittesöövitav
4-(metüültio)-bensaldehüüd	222-365-7	3446-89-7	mittesöövitav

Enamik loetletud kemikaale on võetud ECVAMi rahvusvahelise valideerimisuringu (4) jaoks valitud kemikaalide loetelust. Nende valimine põhineb järgmistel kriteeriumidel:

- i) söövitavate ja mittesöövitavate ainete võrdne arv;

▼B

- ii) kaubanduslikult kättesaadavad ained, millega on hõlmatud olulisemad keemiliste ainete klassid;
- iii) tugevalt söövitavate ja vähem söövitavate ainete lisamine loetellu, et võimaldada vahetegemist söövitusvõime alusel;
- iv) kemikaalid, mis ei kujuta laboris kasutamisel muud tõsist ohtu peale söövitava toime.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritav aine kantakse kuni 24 tunniks nahaliistakute epidermisele kahekambrikses katsesüsteemis, milles nahaliistakud toimivad vaheseinana kambrite vahel. Nahaliistakud võetakse humaansel viisil surmatud 28–30 päeva vanustelt rottidelt. Söövitavad ained tehakse kindlaks nende võime järgi põhjustada normaalse sarvkihi (*stratum corneum*) terviklikkuse ja kaitsefunktsiooni kadumist, mida näitab TERi vähenemine allapoole läviväärtust (12). Roti TERi kriitiliseks väärtuseks on valitud 5 kΩ, selle valiku aluseks on suur hulk andmeid mitmesuguste kemikaalide kohta, kus enamik väärtusi olid kas tuntavalt üle (sageli rohkem kui 10 kΩ) või alla (sageli vähem kui 3 kΩ) selle väärtuse (12). Ained, mis ei ole loomadele mitesöövitavad, kuid on ärritavad või mitteärritavad, üldiselt ei vähenda TERi sedavõrd, et see langeb alla kõnealuse kriitilise väärtuse. Muude nahapreparaatide või muu aparatuuri kasutamine võib seejuures muuta seda kriitilist väärtust ning sel juhul on vajalik täiendav valideerimine.

Meetodile on lisatud värvaine sidumise etapp, et kinnitada katsetamisel saadavaid TERi positiivseid tulemusi, sealhulgas 5 kΩ lähedal olevaid väärtusi. Värvaine sidumisega määratakse kindlaks, kas ioonilise läbitavuse suurenemine on tingitud sarvkihi füüsilisest hävimisest. TERi meetodiga suudeti rotinahka kasutades prognoosida *in vivo* söövitavat toimet jänesel, mida hinnati katsemeetodiga B.4 (2). Tuleb märkida, et *in vivo* katse jänesega on äärmiselt konservatiivne, nii naha söövitamise kui ka nahaärrituse seisukohast, võrreldes inimnaha tükikese katsega (15).

1.5. MEETODI KIRJELDUS

1.5.1. Katseloomad

Valitud liigiks on rott, kuna eelnevalt on tõendatud roti naha tundlikkus kemikaalide suhtes selles katses (viide 10). Roti vanus (naha võtmise hetkel) ja aretusliin on eriti tähtsad, kuna peab olema tagatud, et karvanääpsud on uinuvus faasis enne täiskasvanu karvakasvu algust.

▼B

Väikeste kääridega eemaldatakse hoolikalt noorte, umbes 22päevaste (Wistar-päritolu või võrreldava aretusliiniga) emas- või isasrottide selja- ja küljekarv. Seejärel pestakse loomad hoolikalt pühkides ning püगतud piirkond kastetakse üleni antibiootikumilahusesse (mis sisaldab näiteks streptomüsiini, penitsilliini, klooramfenikooli ja amfoteritsiini kontsentratsioon, mis pidurdab bakterite kasvu). Loomi pestakse antibiootikumidega uuesti kolmandal või neljandal päeval pärast esimest puhastust ning kasutatakse kolme päeva jooksul pärast teist puhastust, kui sarvkiht on karvade eemaldamisest paranenud.

1.5.2. Nahaliistakute ettevalmistamine

Loomad surmatakse humaansel viisil 28–30 päeva vanuses; see vanus on väga oluline. Seejärel eemaldatakse iga looma selja- ja küljenahk ning tõmmatakse sellelt ettevaatlikult maha liigne nahalune rasvakiht. Nahast võetakse ümmargused liistakud läbimõõduga umbes 20 mm. Nahka võib enne liistakute kasutamist säilitada, kui on tõendatud, et positiivsed ja negatiivsed kontrollandmed on samaväärsed värsket nahka kasutades saadud andmetega.

Iga nahaliistak asetatakse polütetrafluoroetüleenitoru (edaspidi: PTFE-toru) ühele otsale, nii et toruga on kontaktis epidermise-poolne pind. Toru otsa surutakse naha paigal hoidmiseks kummist rõngastihend ja liigne kude lõigatakse ära. Toru ja rõngastihendi mõõtmed on esitatud joonisel 2. Seejärel ühendatakse kummist rõngastihendi ja PTFE-toru ühenduskoht hoolikalt vaseliiniga. Toru kinnitatakse vedruklambriga vastuvõtunõus, mis sisaldab magneesiumsulfaadi ($MgSO_4$) lahust (154 mM) (joonis 1). Kogu nahaliistak peab asuma $MgSO_4$ lahuses. Ühe roti nahast võib saada 10–15 nahaliistakut.

Enne katse algust mõõdetakse iga looma naha kvaliteedi kontrollimiseks kahe nahaliistaku elektritakistus. Mõlema liistaku elektritakistus peaks olema suurem kui 10 k Ω , ainult siis tohib ülejäänud liistakuid kasutada. Kui takistus on väiksem kui 10 k Ω , tuleb kõik sellest nahast saadud liistakud ära visata.

1.5.3. Uuritavate ja kontrollainete pealekandmine

Uurimismudeli adekvaatse toimimise tagamiseks tuleks igas uuringus kasutada paralleelselt nii positiivseid kui ka negatiivseid kontrollaineid. Tuleks kasutada ühelt ja samalt loomalt saadud nahaliistakuid. Soovitavad positiivsed ja negatiivsed kontrollained on vastavalt 10 M soolhappe ja destilleeritud vesi.

Vedelad katseained (150 μ l) kantakse ühtlaselt toru sees olevale epidermisele. Tahke aine uurimisel kantakse piisav kogus tahket ainet ühtlaselt nahaliistakule, nii et kogu epidermise pind on kaetud. Tahkele ainele valatakse deioniseeritud vett (150 μ l) ja toru raputatakse ettevaatlikult. Nahaga maksimaalse kontakti saavutamiseks võib tahke aine olla sulamiseks või pehmenemiseks soojendatud kuni 30 °C-ni või peenestatud teralise materjali või pulbri saamiseks.

▼B

Iga uuritava ja kontrollaine puhul kasutatakse kolme nahaliistakut. Uuritav aine kantakse liistakule 20–23 °C juures 24 tunniks. Uuritav aine kõrvaldatakse pesemisega kuni 30kraadise kraanivee joa all, kuni täiendavat materjali maha pesta enam ei õnnestu.

1.5.4. TERi mõõtmise

Naha impedantsi – TERi – mõõdetakse madalpingel töötava Wheatstone'i vahelduvvoolusilla abil (13). Mõõtesilla üldised tehnilised näitajad on järgmised: tööpinge 1–3 V, siinus- või ristkülikvahelduvvool sagedusega 50–1 000 Hz ja mõõtediapasoon vähemalt 0,1–30 k Ω . Valideerimisel kasutatud mõõtesillaga mõõdetakse induktiivsust, mahtuvust ja takistust kuni väärtusteni vastavalt 2 000 H, 2 000 μ F ja 2 MD sagedustel 100 Hz või 1 kHz, kasutades jada- või rööpühenduse puhul saadud näitusid. TERi määramiseks söövitavuskatses registreeritakse takistuse väärtused sagedusel 100 Hz, kasutades jadaühenduse puhul saadud näitusid. Enne elektritakistuse mõõtmist vähendatakse naha pindpinevust, lisades epidermise katmiseks piisavas koguses 70 %list etanooli. Mõne sekundi pärast eemaldatakse etanool torust ja kude niisutatakse 3 ml MgSO₄ lahuse (154 mM) lisamisega. Nahaliistaku mõlemale küljele paigutatakse mõõtesilla elektrodid, et mõõta takistust ühikutes k Ω /nahaliistak (joonis 1). Elektroodi mõõtmed ja hammasklambrist allapoole ulatava elektroodiosa pikkus on esitatud joonisel 2. Sisemisele elektroodile kinnitatav klamber toetub takistuse mõõtmise ajal PTFE-toru otsale, nii et elektrood on ettenähtud pikkuses sukeldatud MgSO₄ lahusesse. Välimine elektrood paigutatakse vastuvõtunõusse nii, et see toetub nõu põhjale. Vedruklambri ja PTFE-toru põhja vaheline kaugus hoitakse konstantne (joonis 2), sest see kaugus mõjutab saadud takistuse väärtust. Seega peaks vahemaa sisemise elektroodi ja nahaliistaku vahel olema konstantne ja minimaalne (1–2 mm).

Kui mõõdetud takistuse väärtus on üle 20 k Ω , võib see olla tingitud nahaliistaku epidermist katva katseaine jääkidest. Võib proovida seda kihti veel kord eemaldada, näiteks sulgedes PTFE-toru kinnastatud pöidlaga ja loksutades seda umbes kümne sekundi jooksul; MgSO₄ lahus valatakse ära ja takistuse mõõtmist korratakse värske MgSO₄ lahusega.

Katseadme omadused ja mõõtmed ning katse läbiviimise kord võivad mõjutada saadud TERi väärtusi. Söövituse läviväärtus 5 k Ω töötati välja käesolevas metoodikas kirjeldatud konkreetse seadme ja mõõtmismeetodiga saadud andmete põhjal. Katsetingimuste muutmisel või teistsuguse seadme kasutamisel võivad lävi- ja kontrollväärtused olla teised. Seepärast on vaja metoodika ja takistuse läviväärtused kalibreerida, tehes mõõtmisi valideerimisel kasutatud kemikaalide (4 ja 5) või uuritavate kemikaalidega sarnaste keemiliste klasside hulgast valitud etalonkemikaalidega. Sobivate etalonkemikaalide loetelu on esitatud tabelis 1.

▼B**1.5.5. Värvaine sidumisel põhinevad meetodid**

Teatavate mittesöövitavate ainetega kokkupuutumise tulemusel võib takistus väheneda alla kriitilise väärtuse 5 kΩ, võimaldades ioonivoogudel liikuda läbi sarvkihi ja vähendades niimoodi elektritakistust (5). Näiteks võivad pinnakihti mõjutavate omadustega neutraalsed orgaanilised ühendid ja kemikaalid (sealhulgas detergendid, emulgatorid ja muud pindaktiivsed ained) eemaldada nahast lipiidid, muutes kaitsekihi ionidele paremini läbitavaks. Kui uuritavate ainete TERi väärtused nähtavate kahjustuste puudumise korral on väiksemad kui 5 kΩ või sellega võrdsed, tuleks seepärast nii kontroll- kui ka katsekoega viia läbi värvaine sissetungimise määramine, mis võimaldab otsustada, kas saadud TERi väärtused olid põhjustatud naha suurenenud läbilaskevõimest või söövitusest (3 ja 5). Viimasel juhul tungib värvaine sulforodamiin B nahapinnale kantuna vigastatud sarvkihi kohalt kiiresti läbi naha ja värvib nahaalused koed. See konkreetne värvaine on püsiv paljude kemikaalide suhtes ning seda ei mõjuta allpool kirjeldatud ekstraheerimine.

1.5.5.1. Värvaine sulforodamiin B pealekandmine ja kõrvaldamine

Pärast TERi määramist valatakse magneesiumsulfaat torust välja ja nahka uuritakse hoolikalt märgatavate kahjustuste suhtes. Kui märgatavaid kahjustusi ei ole, kantakse iga nahaliistaku epidermise küljele kaheks tunniks 150 µl värvaine sulforodamiin B (happeline punane 52; C.I. 45100; EINECSi number 222-529-8; CASi number 3520-42-1) 10 %list (mass/maht) lahust destilleeritud vees. Seejärel pestakse nahaliistakuid mitte soojema kui toatemperatuuril kraaniveega ligikaudu kümme sekundit liigse/mitteseotud värvaine eemaldamiseks. Iga nahaliistak eemaldatakse ettevaatlikult PTFE-torult ja asetatakse väikesse pudelisse (nt 20 ml klaasist stsintillatsioonianum), mis sisaldab deioniseeritud vett (8 ml). Pudelikesi loksutatakse ettevaatlikult viis minutit, et eemaldada kogu mitteseotud värvaine. Seejärel loputusprotseduuri korratakse ning pärast seda eemaldatakse nahaliistakud ja pannakse väikesesse pudelitesse, mis sisaldavad 5 ml 30 %list (mass/maht) naatriumdodetsüülsulfaadi (SDS) lahust destilleeritud vees ning inkubeeritakse temperatuuril 60 °C hommikuni.

Pärast inkubeerimist eemaldatakse nahaliistakud ja visatakse ära ning järelejäänud lahust tsentrifuugitakse kaheksa minutit temperatuuril 21 °C (suhteline tsentrifugaaljõud ~175 g). Seejärel lahjendatakse supernatandist võetud 1 ml proovi viis korda (maht/maht) (st 1 ml + 4 ml) 30 %lise (massi/mahuprotsent) SDSiga destilleeritud vees. Mõõdetakse lahuse optiline tihedus lainepikkusel 565 nm.

1.5.5.2. Värvaine sisalduse arvutamine

Värvaine sulforodamiin B sisaldus liistakus arvutatakse optilise tiheduse väärtustest (5) (värvaine sulforodamiin B molaarne ekstinktsioonikoefitsient lainepikkusel 565 nm on $8,7 \times 10^4$; molekulmass on 580). Sobiva kalibreerimiskõvera abil määratakse värvainesisaldus igas nahaliistakus ning seejärel arvutatakse värvaine keskmine sisaldus paralleelkatsetes.

2. ANDMED

Takistuse väärtused (kΩ) ja värvainesisalduse keskmised väärtused (µg/liistak) tuleks võimaluse korral esitada tabelina nii uuritava aine kui ka positiivse ja negatiivse kontrollproovi kohta (üksikkatsete tulemused ja keskmised ± standardhälve); esitatakse kõigi paralleel- või korduskatsete tulemused, keskmised ja individuaalsed väärtused.

▼B

2.1. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

TERi keskmised tulemused on aktsepteeritavad, kui samaaegsete positiivsete ja negatiivsete kontrollkatsete väärtused langevad väärtuste lubatud vahemikku, mis on mõõtmist läbiviivas laboris saadud käesoleva meetodi puhul. Lubatud takistuse piirväärtused eespool kirjeldatud meetodika ja seadme puhul on esitatud järgmises tabelis:

Kontrollkatse	Aine	Takistuse vahemik (kΩ)
positiivne	10 M soolhape	0,5–1,0
negatiivne	destilleeritud vesi	10–25

Värvaine sidumise keskmised tulemused on aktsepteeritavad tingimusel, et samaaegsed kontrollväärtused jäävad meetodi jaoks lubatud piiridesse. Soovitavad aktsepteeritavad värvainesisalduse vahemikud kontrollainete jaoks eespool kirjeldatud meetodika ja seadme puhul on järgmised:

Kontrollkatse	Aine	Värvainesisalduse vahemik (µg/liistak)
positiivne	10 M soolhape	40–100
negatiivne	destilleeritud vesi	15–35

Katseainet peetakse nahka mitte söövitavaks, kui

- i) uuritava aine jaoks saadud TERi keskmine väärtus on üle 5 kΩ või
- ii) TERi keskmine väärtus on väiksem kui 5kΩ või sellega võrdne ja

— nahaliistakul ei näi olevat silmanähtavat kahjustust;

— nahaliistaku keskmine värvainesisaldus on palju väiksem liistaku keskmisest värvainesisaldusest samaaegselt tehtud positiivses kontrollkatses 10 M HCl-ga.

Katseaine loetakse nahka söövitavaks, kui:

- i) TERi keskmine väärtus on väiksem kui 5 kΩ või sellega võrdne ja nahaliistak on märgatavalt kahjustatud või
- ii) TERi keskmine väärtus on väiksem kui 5 kΩ või sellega võrdne ja

— nahaliistakul ei paista märgatavat kahjustust, aga

— nahaliistaku keskmine värvainesisaldus on suurem kui liistaku keskmine värvainesisaldus samaaegselt läbiviidud positiivses kontrollkatses 10 M HCl-ga või sellega võrdne.

▼B**3. ARUANDLUS****3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuandes esitatakse järgmine teave.

Uuritav aine ja kontrollaine:

- keemiline nimetus või nimetused, nagu IUPACi või CASi nimetus ja CASi number, kui on teada;
- aine puhtus või valmisuse koostis (massiprotsendina), füüsikalised omadused;
- füüsikalise-keemilised omadused nagu füüsiline olek, pH, püsivus, lahustuvus vees, mis on olulised katse
- läbiviimise seisukohast;
- uuritava/kontrollaine töötlemine enne katset, kui see on asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);

püsivus, kui on teada.

- Katseloomad:
- kasutatud aretusliinid ja sugu;
- looma vanus doonorloomana kasutamise hetkel;
- päritolu, pidamistingimused, toit jms;

naha ettevalmistamise üksikasjad.

- Katsetingimused:
- katseseadme kalibreerimiskõverad;
- kalibreerimiskõverad värvaine sidumise katse läbiviimiseks;
- TERi mõõtmise meetodi üksikasjad;
- värvaine sidumise määramismeetodi üksikasjad (vajaduse korral);
- kõigi metoodikas tehtud muudatuste kirjeldus;

kasutatud hindamiskriteeriumide kirjeldus.

- Tulemused:
- andmetabelid TERi ja värvaine sidumise katsete kohta (kui sellised katseid tehti) üksikute loomade ja üksikute nahaproovide kaupa; mis tahes täheldatud muutuste kirjeldus.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. VIITED

- 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/2001/doc.nsf/LinkTo/env-jm-mono\(2001\)6](http://www.olis.oecd.org/olis/2001/doc.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, 62pp.
- 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 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>
- 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 EpiDerm™, 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/epiddocs/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 -modifications and validation. Fd. Chem. Toxicol. 24, 507-512.

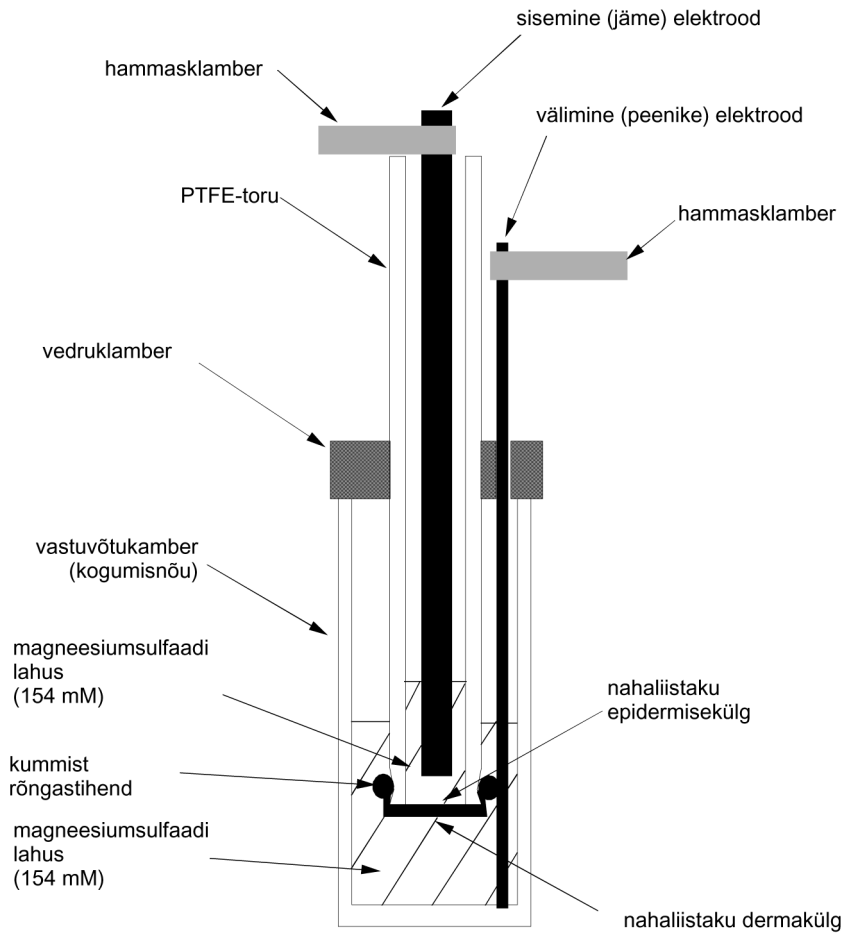
▼B

- 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

Joonis 1

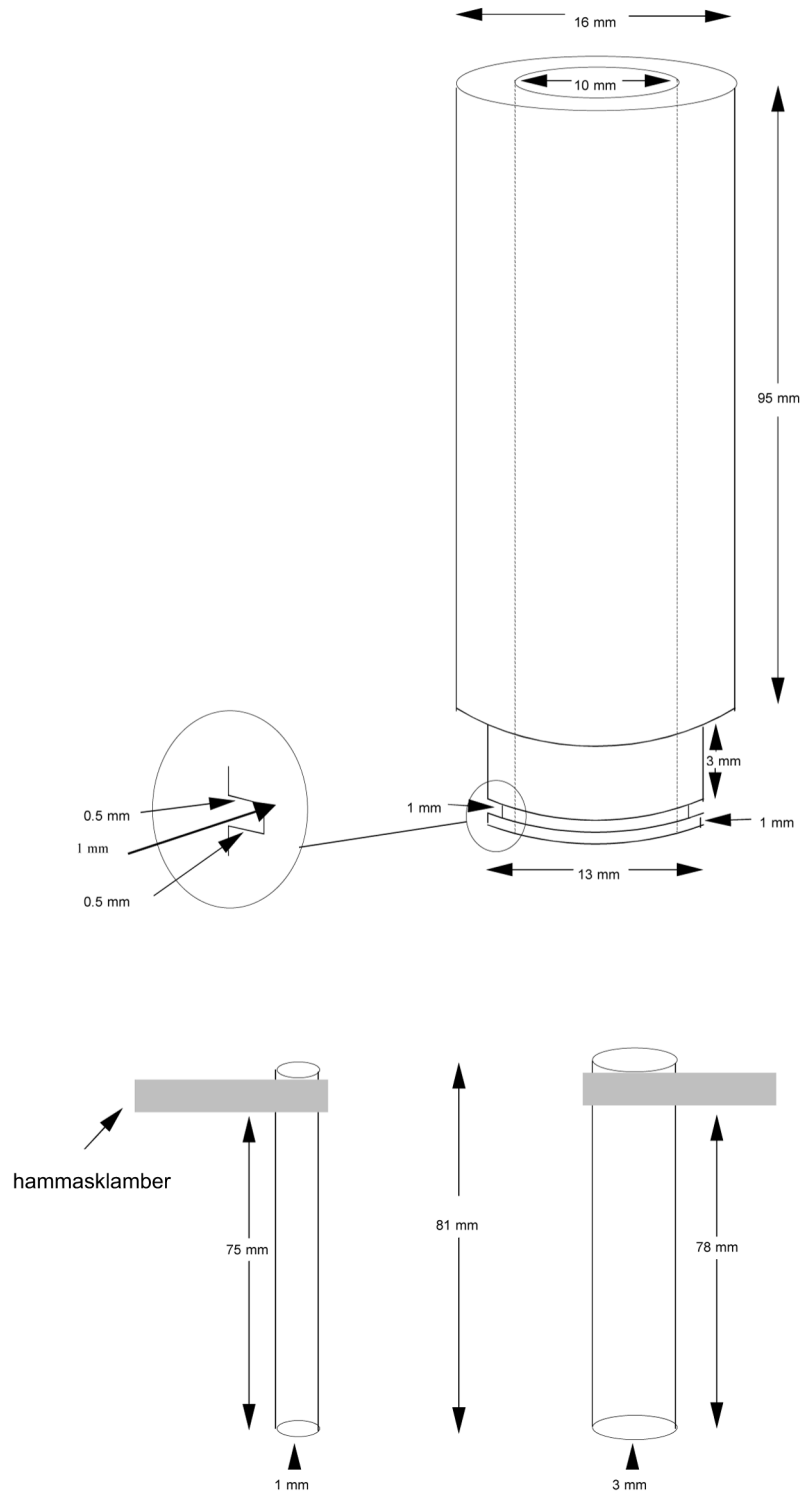
Rotinaha TERi mõõtmisel kasutatav seade



▼B

Joonis 2

Polütetrafluoroetüleentoru (PTFE-toru) j a vastuvõtunõu ning kasutatud elektroodide mõõtmed



▼B**Olulised tegurid eespool kujutatud seadme puhul:**

- PTFE-toru siseläbimõõt;
- elektrootide pikkus PTFE-toru ja vastuvõtunõuga võrreldes on selline, et nahaliistak ei puutuks elektrootide vastu ning et elektrooti teatav standardpikkus oleks kokkupuutes $MgSO_4$ lahusega;
- $MgSO_4$ lahuse hulk vastuvõtunõus peaks vedeliku tasemega PTFE torus võrreldes olema selline, et vedeliku sügavus vastaks joonisel 1 näidatule;
- nahaliistak peaks olema kinnitatud PTFE-toru külge nii hästi, et elektritakistus iseloomustaks tõepoolest naha omadusi.

▼B**B.40b. NAHASÖÖVITUS *IN VITRO*: KATSE INIMNAHA MUDELIGA****1. MEETOD**

Käesolev katsemeetod vastab suunisele OECD TG 431 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Nahasöövitus tähendab pöördumatu koekahjustuse tekitamist nahas uuritava ainega (vastavalt keemiliste ainete ja segude liigitamise ja märgistamise ülemaailmselt harmoneeritud süsteemi (GHS) määratlusele) (1). Käesoleva meetodi puhul ei kasutata nahka söövitava toime hindamiseks elusloomi ega loomset kudet.

Nahka söövitava toime hindamisel on tavaliselt kasutatud laboriloomi (2). Kuna selline määramine põhjustab loomadele valu ja kannatusi, töötati välja katsemeetodi B.4 uus versioon, millega saab nahka söövitavat toimet hinnata alternatiivsete *in vitro* meetoditega, vältides loomadele valu ja kannatuste tekitamist.

Esimene samm muude katsete määratlemisel, mida saaks kasutada nahka söövitava toime uurimiseks õigusliku reguleerimise eesmärgil, oli eelvalideerimisuuring (3). Seejärel viidi läbi nahasöövituse hindamise *in vitro* meetodite (4 ja 5) vormikohane valideerimine (6, 7 ja 8). Kõnealuste uuringute ja muude kirjandusandmete (9) alusel soovitatakse *in vivo* nahka söövitava toime määramiseks kasutada järgmisi katseid (10–13): katse inimnaha mudeliga (käesolev meetod) ja transkutaanse elektritakistuse mõõtmine (vt katsemeetod B.40).

Valideerimisuuringutega on näidatud, et katsetega inimnaha mudelil (3, 4, 5 ja 9) saab usaldusväärselt eristada teadaolevaid nahka söövitavaid ja mittesöövitavaid aineid. Katseprotokolli alusel võib samuti teha järeldusi, kas aine kuulub nahka tugevalt või nõrgalt söövitavate ainete hulka.

Käesolevas metoodikas kirjeldatud katse võimaldab kindlaks teha söövitavad keemilised ained ja segud. Samuti võimaldab see kindlaks määrata mittesöövitavad ained ja segud, kui seejuures arvestatakse ka muid kaalukaid tõendeid (nt pH, struktuuri-aktiivsuse seos, inim- või loomkatsete andmed) (1, 2, 13 ja 14). Katse ei anna üldiselt piisavat teavet nahaärrituse kohta, samuti ei võimalda see söövitavate ainete liigitamist ülemaailmselt harmoneeritud liigitus süsteemi (GHS) (viide 1) lubatavuskriteeriumide alusel alamkategoriasse.

Lokaalse nahatoime täielikul hindamisel pärast naha ühekordset kokkupuudet ainega on soovitatav järgida järjestikuste katsete strateegiat, mis on esitatud katsemeetodi B.4 (2) lisas ja ülemaailmselt harmoneeritud süsteemis (1). Nimetatud strateegia hõlmab *in vitro* katsete läbiviimist nahasöövituse (nagu kirjeldatud käesolevas meetodis) ja nahaärrituse uurimiseks, enne kui hakatakse kaaluma katsete läbiviimist elusloomadega.

▼B

1.2. MÕISTED

Nahasöövitus *in vivo* – pöördumatu kahjustuse tekitamine nahas: läbi epidermise pärisnahka (dermasse) ulatuv nähtav nekroos, mis tekib kuni neljatunnisel kokkupuutel katseainega. Söövitusreaktsioonide tüüpilised avaldumisvormid on haavandid, verejooks, verised kärnad ning 14päevase vaatlusperioodi lõpuks värvimuutus naha valastumise tõttu, täielikult karvavabad alad ja armid. Küsitavate kahjustuste hindamiseks tuleks kaaluda histopatoloogilisi uuringuid.

Rakkude eluvõimelisus – rakupopulatsiooni üldist aktiivust (nt raku mitokondrite dehüdrogenaaside võime taandada vitaalvärvainet MTT) väljendav parameeter, mis olenevalt mõõdetavast muutujast ja katseplaanist korreleerub rakkude koguarvu ja/või vitaalsusega.

1.3. VÕRDLUSAINED

Tabel 1

Etalonkemikaalid

Nimetus	EINECSI number	CASI nr	
1,2-diaminopropan	201-155-9	78-90-0	tugevalt söövitav
akrüülhape	201-177-9	79-10-7	tugevalt söövitav
2-tert-butüülfenool	201-807-2	88-18-6	söövitav
kaaliumhüdrosiid (10 %)	215-181-3	1310-58-3	söövitav
väävelhape (10 %)	231-639-5	7664-93-9	söövitav
oktaanhape (kaprüülhape)	204-677-5	124-07-02	söövitav
4-amino-1,2,4-triasool	209-533-5	584-13-4	mittesöövitav
eugenool	202-589-1	97-53-0	mittesöövitav
fenetüülbromiid	203-130-8	103-63-9	mittesöövitav
tetrakloroetüleen	204-825-9	27-18-4	mittesöövitav
isosteariinhape	250-178-0	30399-84-9	mittesöövitav
4-(metüültio)-bensaldehüüd	222-365-7	3446-89-7	mittesöövitav

Enamik loetletud kemikaale on võetud ECVAMi rahvusvahelise valideerimisuuringu (4) jaoks valitud kemikaalide loetelust. Nende valimine põhineb järgmistel kriteeriumidel:

- i) söövitavate ja mittesöövitavate ainete võrdne arv;
- ii) kaubanduslikult kättesaadavad ained, millega on hõlmatud olulisemad keemiliste ainete klassid;
- iii) tugevalt söövitavate ja vähem söövitavate ainete lisamine loetellu, et võimaldada vahetegemist söövitusvõime alusel;

▼B

- iv) kemikaalid, mis ei kujuta laboris kasutamisel muud tõsist ohtu peale söövitava toime.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritav aine kantakse paikset kolmemõõtmelisele inimnaha mudelile, mis sisaldab vähemalt talitleva sarvkihiga (*stratum corneum*) rekonstrueeritud epidermist. Söövitavad ained tehakse kindlaks nende võime järgi vähendada rakkude eluvõimelisust (mis määratakse näiteks MTT taandamise katse abil (15)) alla kindlaksmääratud läviväärtuse kindla toimeaja jooksul. Inimnaha mudeli katse põhineb hüpoteesil, et söövitavad kemikaalid suudavad difusiooni või erosiooni teel tungida läbi sarvkihi ja on tsütotoksilised allpool asuvatele rakukihtidele.

1.4.1. Katse käik

1.4.1.1. Inimnaha mudelid

Võib kasutada tööstuslikult konstrueeritud või saadud inimnaha mudelit (nt mudelid EpiDerm™ ja EPISKIN™) (16–19) või mudelit, mis on välja töötatud või konstrueeritud oma laboris (20 ja 21). Inimese naha kasutamine toimub muidugi vastavalt iga riigi ja rahvusvahelistele eetilistele tõekspidamistele ja tingimustele. Iga uus mudel tuleks valideerida (vähemalt sel määral, nagu kirjeldatud punktis 1.4.1.1.2). Käesolevas katses kasutatavad inimnaha mudelid peavad vastama järgmistele tingimustele:

1.4.1.1.1. Mudeli üldised tingimused

Epiteelkoe ehitamiseks tuleb kasutada inimese epiteelrakke (keratinoosüüte). Talitleva sarvkihi all peab olema mitu kihti eluvõimelisi epiteelrakke. Nahamudelis võib olla ka stroomakiht. Sarvkiht peab olema mitmekihiline ja vajaliku lipiidse koostisega, et tekiks sellise tugevusega funktsionaalne kaitsekiht, mis suudab takistada tsütotoksiliste markerite kiiret läbitungimist. Mudel peab olema selline, et aine ei saaks tungida eluskudedesse sarvkihist mööda minnes. Kui uuritav aine pääseb sarvkihist mööda, siis ei modelleeri see süsteem enam uuritava aine kokkupuutumist nahaga. Nahamudel ei tohi olla saastunud bakterite (sealhulgas mükoplasma) ega seentega.

1.4.1.1.2. Mudeli funktsionaalsed tingimused

Eluvõimelisust mõõdetakse tavaliselt MTT või muude metaboolselt muundatavate vitaalvärvainete abil. Sellisel juhul peab negatiivse kontrolli koostisest ekstraheeritud (lahustatud) värvaine optiline tihedus (OD) olema vähemalt 20 korda suurem kui ekstraheerimislahuse OD (vt ülevaade, 22). Negatiivse kontrolli kude peaks olema kasvatamisel stabiilne (eluvõimelisuse näitajad ei tohiks muutuda) kogu katseaja jooksul. Sarvkiht peaks olema piisavalt tugev, et teatavad tsütotoksilised markerkemikaalid (nt 1 % Triton X-100) ei saaks sellest kiiresti läbi tungida. Seda omadust saab hinnata kokkupuuteteaja järgi, mis on vajalik rakkude eluvõimelisuse vähendamiseks 50 % võrra (ET₅₀) (nt EpiDerm™ ja EPISKIN™ mudelite puhul on see üle kahe tunni). Kudet peaks saama reprodutseerida ajas ja eelistatavalt ka eri laborites. Lisaks peaks koega saama valitud katsemeetodit kasutades prognoosida võrdluskemikaalide (vt tabel 1) söövitusvõimet.

▼B1.4.1.2. *Uuritavate ja kontrollainete pealekandmine*

Iga töötlemise (kokkupuuteaja), sealhulgas kontrollproovide puhul kasutatakse kahte ühesugust koeproovi. Vedela aine korral tuleb nahale kanda piisav kogus uuritavat ainet, et see kataks naha ühtlaselt: tuleks kasutada vähemalt 25 µl/cm². Tahket uuritavat ainet tuleb nahale kanda piisav kogus, et see kataks kogu naha ühtlaselt, ja niisutada deioniseeritud või destilleeritud veega, et tagada hea kontakt nahaga. Tahked ained tuleks enne pealekandmist peenestada vajaduse korral pulbriks. Tuleb valida uuritava aine kohane pealekandmise meetod (vt nt viidet 5). Kokkupuuteperioodi lõpus tuleb katseaine nahapinnalt hoolikalt maha pesta sobiva puhverlahusega või 0,9 %lise NaCl lahusega.

Uurimismudeli adekvaatsuse tõendamiseks tuleks igas uuringus kasutada paralleelselt nii positiivseid kui ka negatiivseid kontrollaineid. Soovitavad positiivsed kontrollained on jää-äädikhape või 8N KOH. Soovitavad negatiivsed kontrollained on 0,9 %line NaCl või vesi.

1.4.1.3. *Rakkude eluvõimelisuse mõõtmine*

Rakkude eluvõimelisuse mõõtmiseks võib kasutada ainult kvantitatiivseid valideeritud meetodeid. Lisaks peab eluvõimelisuse mõõt sobima kasutamiseks kolmemõõtmelises koekonstruksioonis. Värvaine mittespetsiifiline sidumine ei tohi segada eluvõimelisuse mõõtmist. Seepärast ei sobi valku siduvad värvained ja ained, mida metaboolselt ei muundata (nt neutraalpunane). Kõige sagedamini kasutatav katse on MTT [3-(4,5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetra-sooliumbromiid, tiasolüülsinine: EINECSI number 206-069-5, CASi number 298-93-1] taandamine, mille kohta on näidatud, et tulemused on täpsed ja reprodutseeritavad (5), kuid kasutada võib ka muid. Nahaproov asetatakse sobiva kontsentratsiooniga (nt 0,3–1 mg/ml) MTT lahusesse sobival inkubatsioonitemperatuuril kolmeks tunniks. Sadestunud sinine formasaan ekstraheeritakse seejärel lahustiga (isopropanool) ja formasaani kontsentratsioon määratakse OD mõõtmisega lainepikkusel 540–595 nm.

Uuritava aine keemiline toime vitaalvärvile võib jäljendada raku ainevahetust, mille tagajärjel hinnatakse eluvõimelisust valesti. See juhtub siis, kui uuritavat ainet ei ole loputamiseга nahalt täielikult eemaldatud (9). Kui uuritav aine reageerib otse vitaalvärviga, tuleks kasutada täiendavaid kontrollproove, et avastada ja parandada uuritava aine segavat mõju eluvõimelisuse määramisele (9 ja 23).

2. **ANDMED**

Iga koe puhul esitatakse OD väärtused ja rakkude eluvõimelisuse andmed (protsentides) uuritava aine ning positiivsete ja negatiivsete kontrollproovide kohta tabelina; tabelis esitatakse ka andmed dubleeritud korduskatsetest, kui neid tehti, ning keskmised ja individuaalväärtused.

▼B

2.1. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Iga uuritava proovi kohta saadud OD väärtusi saab kasutada selleks, et arvutada rakkude eluvõimelisuse protsent, võrreldes negatiivse kontrollprooviga, mille eluvõimelisus on võetud võrdseks 100 %ga. Rakkude eluvõimelisuse protsendi kriitiline väärtus, mille alusel jagatakse ained söövitavateks ja mittedöövivateks (või erineva söövitusvõimega ainete klassidesse), ning statistikameetodid, mida kasutatakse tulemuste hindamiseks ja söövitavate ainete kindlaksmääramiseks, tuleb selgesti määratleda ja dokumenteerida ning nende valik peab olema põhjendatud. Üldiselt määratakse need kriitilised väärtused katse optimeerimise käigus, neid katsetatakse eelvalideerimise etapis ja kinnitatakse valideerimisuuringuga. Näiteks söövitava toime ennustamine EpiDerm™ mudeliga tehtud katse alusel toimub järgmiselt (9).

Uuritav aine loetakse nahka söövitavaks, kui

- i) eluvõime pärast kolmeminutilist kokkupuudet on alla 50 % või
- ii) eluvõime pärast kolmeminutilist kokkupuudet on suurem kui 50 % või sellega võrdne ja eluvõime pärast ühetunnist kokkupuudet on alla 15 %.

Uuritav aine loetakse nahka mittedöövivateks, kui

- i) eluvõime pärast kolmeminutilist kokkupuudet on suurem kui 50 % või sellega võrdne ja eluvõime pärast ühetunnist kokkupuudet on 15 % või üle selle.

3. ARUANDLUS

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuandes tuleb esitada järgmine teave.

Uuritav ja kontrollaine:

- keemiline nimetus või keemilised nimetused, nagu IUPACi või CASi nimetus ja CASi number, kui on teada;
- aine puhtus või valmisuse koostis (massiprotsendina);
- füüsikalise-keemilised omadused, nagu füüsiline olek, pH, püsivus, lahustuvus vees, mis on olulised katse läbiviimise seisukohast;
- uuritava/kontrollaine töötlemine enne katset, kui see on asjakohane (nt soojustamine, peenestamine);
- püsivus, kui on teada.

Kasutatud nahamudeli ja katse tegemise käigu põhjendus.

Katsetingimused:

- kasutatud rakusüsteem;
- rakkude eluvõimelisuse mõõtmiseks kasutatud mõõteriista (nt spektrofotomeetri) kaliibrimist käsitlev teave;

▼B

- kogu täiendav teave kasutatud konkreetse nahamudeli ja selle valideerimise kohta;
- katsete meetoodika üksikasjad;
- kasutatud uuritavad annused;
- kõigi meetoodikas tehtud muudatuste kirjeldus;
- viide varasematele andmetele mudeli kohta;
- kasutatud hindamiskriteeriumide kirjeldus.

Tulemused:

- andmetabelid individuaalsete uuritavate proovide kohta;
- mis tahes täheldatud toimete kirjeldus.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. VIITED

- 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](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., Ponc, 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, 62pp.
- 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. MH 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. 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/epidocs/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 assays. *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) Ponc, 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. *Cyotechnology* 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* J15, 57-93.

▼B**B.41. IN VITRO 3T3 NRU FOTOTOKSILISUSE KATSE****1. MEETOD**

Käesolev meetod vastab suunisele OECD TG 432 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Fototoksilisust määratletakse kui kehale kantud aine toksilist reaktsiooni, mis tekib või (madalama doosi puhul) ägeneb pärast järgnevat kokkupuudet valguskiirgusega või mille kutsub esile naha kiiritamine pärast aine süsteemset manustamist.

In vitro 3T3 NRU fototoksilisuse katsed kasutatakse selleks, et teha kindlaks kokkupuutel valgusega ergastanud uuritava aine fototoksilisus. Katsega hinnatakse fototsütotoksilisust: kuivõrd sõltub rakkude eluvõime vähenemine kemikaaliga kokkupuutumisel sellest, kas see toimub valguse käes või pimedas. Selles katses positiivseks osutunud ained on tõenäoliselt fototoksilised *in vivo* pärast süsteemset manustamist ja naha sisse jõudmist või pärast paikset kasutamist.

Fototoksiline mõju on leitud paljudel kemikaaliliikidel (viited 1–4). Nende ühine omadus on võime neelata valgusenergiat päikesevalguse lainepikkustel. Fotokeemia esimese seaduse (Grotthausi-Draperi seadus) kohaselt on fotoreaktsiooni toimumiseks vajalik piisava hulga valguskvantide neeldumine. Seepärast tuleb enne bioloogilise katse sooritamist määrata uuritava kemikaali UV ja nähtava valguse neeldumisspekter vastavalt OECD katsejuhendile 101. Väidetakse, et kui molaarse ekstinktsiooni/neeldumise koefitsient on väiksem kui $10 \text{ l} \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, ei ole kemikaal tõenäoliselt valgustundlik. Sellisele kemikaalile ei ole vaja teha *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katsed või muud bioloogilist katset kahjuliku fotokeemilise toime kindlakstegemiseks (1 ja 5). Vt ka lisa 1.

Hiljuti hinnati *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katse usaldusväärsust ja asjakohasust (6–9). Näidati, et *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katsega saab prognoosida ägedat fototoksilist reaktsiooni loomadel ja inimestel *in vivo*. Katse eesmärk ei ole prognoosida muid kahjulikke toimeid, mis võivad ilmned a kemikaali ja valguse koostoimel, nagu fotogenotoksilisus, fotoallergia või fotokantserogeensus, samuti ei võimalda see hinnata fototoksilist potentsiaali. Lisaks ei ole katse ette nähtud fototoksilisuse kaudsete mehhanismide, uuritava aine metaboliitide mõju või segude mõju kontrollimiseks.

Kuigi kõigi genotoksilise ja kantserogeense potentsiaali ennustamiseks tehtavate *in vitro* katsete korral on üldiselt nõutav metaboolseeriva süsteemi kasutamine, on seni vähe näiteid, kus kemikaali *in vivo* või *in vitro* fototoksilise toime avaldumiseks on vaja metaboolset transformatsiooni. Seega ei peeta vajalikuks ega teaduslikult põhjendatuks, et käesolevat katset tuleks läbi viia metaboolse aktiveerimissüsteemi abil.

▼ **B**

1.2. MÕISTED

Kiiritustihedus – pinnale langeva ultraviolet- (UV) või nähtava valguse intensiivsus, mida mõõdetakse ühikutes W/m^2 või W/cm^2 .

Kiiritusannus – pinnale langeva ultraviolet- või nähtava kiirguse hulk (s.o intensiivsus \times aeg), mida väljendatakse džaulides (Ws) pinnauhiku kohta, näiteks J/m^2 või J/cm^2 .

UV-valguse lainelad – CIE (Rahvusvaheline Valgustuskomisjon) soovitatud tähistused on järgmised: UVA (315–400 nm), UVB (280–315 nm) ja UVC (100–280 nm). Kasutatakse ka teisi nimetusi; piiriks UVB ja UVA vahel võetakse sageli 320 nm ja UVA võib jagada aladeks UV-A1 ja UV-A2 piiriga umbes 340 nm juures.

Rakkude eluvõimelisus – rakupopulatsiooni üldist aktiivsust (näiteks vitaalvärvi neutraalpunase neeldumist raku lüsoosoomidesse) väljendav parameeter, mis olenevalt mõõdetavast muutujast ja katseplaanist korreleerub rakkude koguarvu ja/või vitaalsusega.

Rakkude suhteline eluvõimelisus – rakkude eluvõimelisus, mida väljendatakse lahusti (negatiivsete) kontrollproovide suhtes, millega tehakse läbi kogu katse (kas +Irr või -Irr), välja arvatud uuritava kemikaaliga töötlemine.

PIF (Photo-Irritation-Factor – fotoärrituvustegur) – tegur, mis põhineb sellel, et võrreldakse uuritava kemikaali kahte võrdselt tsütotoksilist kontsentratsiooni (IC_{50}): valguse puudumisel (-Irr) ja kiiritamisel mittetsütotoksilise UVA või nähtava valgusega (+Irr).

IC_{50} – uuritava kemikaali kontsentratsioon, mis vähendab rakkude elujõulisust 50 %.

MPE (Mean-Photo-Effect – keskmine fotoefekt) – mõõdetav suurus, mis saadakse kontsentratsiooni-mõju sõltuvuste matemaatilise analüüsiga, võrreldes mõju valguse puudumisel (-Irr) ja kiiritamisel mittetsütotoksilise UVA või nähtava valgusega (+Irr).

Fototoksilisus – äge toksiline reaktsioon, mis tekib pärast naha kokkupuudet teatava kemikaaliga ja sellele järgnevat kiiritamist või mida sarnasel viisil tekitab naha kiiritamine pärast kemikaali süsteemset manustamist.

1.3. MEETODI PÕHIMÕTE

In vitro 3T3 NRU fototoksilisuse katses võrreldakse kemikaali tsütotoksilisust pimeduses ja päikesevalgusele samase valguse mittetsütotoksilise annusega kiiritamisel. Tsütotoksilisus avaldub käesolevas katses vitaalvärvi neutraalpunase rakkudes neeldumise vähenemisenähtena, sõltuvalt uuritava aine kontsentratsioonist; seda mõõdetakse 24 tundi pärast uuritava kemikaaliga töötlemist ja kiiritamist (10). Neutraalpunane on nõrk katioonne värvaine, mis tungib mittedifusioonilisel teel kergesti läbi rakumembraani ja koguneb rakus lüsoosoomidesse. Tundliku lüsoosoomimembraani muutused muudavad lüsoosoomid hapraks ja põhjustavad muid muutusi, mis lõpuks osutuvad pöördumatuks. Sellised võõrainete toimed tekkivad muutused vähendavad neutraalpunase neelamist ja sidumist. Nii saab eristada elujõulisi, kahjustatud ja surnud rakke, mis ongi käesoleva katse aluseks.

▼B

Monokihtide saamiseks hoitakse Balb/c 3T3 rakke 24 tundi kasvukeskkonnas. Kaht 96 süvendiga plaati uuritava kemikaali kohta inkubeeritakse uuritava aine kaheksa kontsentratsiooniga 1 tunni vältel. Seejärel kiiritatakse üht kahest plaadist kõrgeima mittetsütotoksilise kiirituse kogusega, samas kui teist plaati hoitakse pimedas. Seejärel asendatakse mõlemal plaadil töötlemiskeskond kasvukeskkonnaga ja pärast edasist 24tunnist inkubeerimist määratakse raku elujõulisus kindlaks neutraalpunase neeldumise kaudu. Rakkude elujõulisus väljendatakse protsendina uuritava ainega töötlemata, kuid lahustit sisaldavate kontrollproovide suhtes ning see arvutatakse uuritava aine iga kontsentratsiooni puhul. Fototoksilise potentsiaali prognoosimiseks võrreldakse kontsentratsiooni-mõju sõltuvusi, mis on saadud pimedas hoitud ja valgusega kiiritatud katsetes, tavaliselt IC₅₀ tasemel, st kontsentratsiooni kaudu, mis vähendab raku eluvõimelisust 50 %, võrreldes uuritava ainega töötlemata kontrollproovidega.

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1. Ettevalmistused

1.4.1.1. *Rakud*

Valideerimisel kasutati hiire fibroblasti püsivat rakuliini Balb/c 3T3, kloon 31, mis pärines kas USA kolleksioonist (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA) või Euroopa kolleksioonist (European Collection of Cell Cultures (ECACC), Salisbury, Wiltshire, UK), ning rakuliin soovitatakse hankida hea tasemega rakuhooldlast. Uurimiseks võib kasutada teisi rakke või rakuliine, kui kasvatamistingimused kohandatakse rakkude erivajadustele, kuid siis on vaja tõendada tulemuste samaväärsust.

Rakke tuleks regulaarselt kontrollida mükoplasma nakkuse suhtes ja kasutada vaid siis, kui seda ei esine (11).

On oluline, et rakkude UV-tundlikkust kontrollitakse regulaarselt vastavalt käesolevas metoodikas kirjeldatud kvaliteedikontrolli eeskirjale. Kuna rakud võivad passaažide arvu suurenemisega muutuda UVA-tundlikumaks, tuleks kasutada Balb/c 3T3 rakke, mille passaažide arv on võimalikult väike, eelistatavalt alla 100 (vt punkti 1.4.2.2.2 ja 2. lisa).

1.4.1.2. *Kasvukeskkonnad ja kultiveerimistingimused*

Rutiinseks rakupassaažiks ja mõõtmiste ajal tuleb kasutada sobivat kasvukeskkonda ja inkubeerimistingimusi, näiteks Balb/c 3T3 rakkude puhul on need DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), millele on lisatud 10 % vastündinud vasika seerumit, 4 mM glutamiini, penitsilliini (100 IU) ja streptomütsiini (100 µg/ml), ning niisutatud inkubatsioon 37 °C ja 5–7,5 % CO₂ juures, olenevalt puhvrast (vt punkti 1.4.1.4 teist lõiku). On väga oluline, et rakukultuuri tingimustega oleks tagatud rakkude olek rakutsükli perioodis, mis on kasutatavate rakkude või kasutatava rakuliini jaoks normaalses ajaloolises vahemikus.

1.4.1.3. *Kultuuride ettevalmistamine*

Külmutatud varukultuuridest pärit rakud külvatakse kasvukeskkonda sobiva tihedusega ja külvatakse ümber vähemalt korra, enne kui neid kasutatakse *in vitro* 3T3 NRU fototoksilise katses.

▼B

Fototoksilisuse katses kasutatavad rakud külvatakse kasvukeskkonda sobiva tihedusega, nii et kultuurid ei laatu katse lõpuks, st selleks ajaks, kui 48 tundi pärast rakkude külvamist määratakse rakkude elujõulisust. Rakkude Balb/c 3T3 kasvatamisel 96 süvendiga plaatidel on soovitatav külvamistihedus 1×10^4 rakku süvendi kohta.

Igas kemikaali uurimise katses külvatakse rakud ühtemoodi kahele eraldi 96 süvendiga plaadile, mida hoitakse seejärel kogu katse ajal ühesugustes kasvutingimustes, välja arvatud ajavahemik, mil üht plaati kiiritatakse (+Irr) ja teist hoitakse pimedas (-Irr).

1.4.1.4 Uuritava aine ettevalmistamine

Uuritav aine peab olema valmistatud vahetult enne kasutamist, välja arvatud juhul, kui andmed näitavad, et aine on hoidmisel püsiv. Soovitatav on kemikaale käsitseda ja rakke esialgselt töödelda sellistes valgustustingimustes, et uuritava aine fotoaktivatsioon või lagunemine enne kiiritamist oleks välistatud.

Uuritavad kemikaalid lahustatakse puhvriga soolalahuses, näiteks Earle'i tasakaalustatud soolalahuses (EBSS: *Earle's Balanced Salt Solution*) või muus füsioloogiliselt tasakaalustatud puhvri lisandiga soolalahuses, mis ei tohi sisaldada valke, valgust neelavaid komponente (näit pH-indikaatorvärvid ja vitamiinid), mis võiksid segada kiiritamist. Kuna kiiritamise ajal hoitakse rakke umbes 50 minutit CO₂-inkubaatorist väljas, tuleb olla ettevaatlik, et ei toimuks leelistumist. Nõrga puhvri nagu EBSSi kasutamisel saab leelistumist vältida rakkude inkubeerimisega 7,5 % CO₂ juures. Kui rakke inkubeeritakse kõigest 5 % CO₂ juures, tuleks valida tugevam puhver.

Halvasti vees lahustuvad uuritavad kemikaalid tuleks lahustada sobivas lahustis. Lahusti kasutamisel peab seda olema ühesugune kogus kõikides kultuurides, st nii negatiivsetes (lahusti) kontrollkatsetes kui ka uuritava kemikaali iga kontsentratsiooni juures, ja lahusti kasutatav kontsentratsioon ei tohi olla tsütotoksiline. Uuritava kemikaali kontsentratsioon tuleb valida nii, et aine ei sadeneks ja et lahuses ei tekiks hägu.

Lahustina soovitatakse kasutada dimetüülsulfoksiidi (DMSO) või etanooli (ETOH). Võib kasutada ka muid madala tsütotoksilisusega lahusteid. Enne kasutamist tuleb hinnata iga lahusti sobivust, arvestades lahusti konkreetseid omadusi, näiteks reageerimine uuritava kemikaaliga, fototoksilise toime nõrgendamine, radikaalide sidumine ja/või kemikaali stabiilsus lahustis.

Lahustamise hõlbustamiseks võib kasutada keerissegamist, ultrahelega töötlemist ja/või soojendamist sobiva temperatuurini, kui see ei mõjuta uuritava kemikaali stabiilsust.

▼B1.4.1.5 *Kiiritamise tingimused*

1.4.1.5.1. Valgusallikas

Sobiva valgusallika ja filtrite valimine on fototoksilisuse katse puhul ülioluline tegur. UVA ja nähtav valgus on tavaliselt seotud fototoksiliste reaktsioonidega *in vivo* (3 ja 12), samas kui UVB on üldiselt vähem oluline; UVB on aga väga tsütotoksiline – lainepikkuse vahemikus 313–280 nm suureneb tsütotoksilisus 1 000 korda (viide 13). Sobiva valgusallika valimise kriteeriumid peavad hõlmama nõuet, et valgusallikas kiirgaks lainepikkusi, mis neelduvad uuritavas kemikaalis (neeldumisspekter), ja et (mõistliku aja jooksul saavutatav) kiiritusannus oleks piisav tuntud fototsütotoksiliste kemikaalide avastamiseks. Lisaks ei tohi kasutatav lainepikkus ja kiiritusannus liigselt kahjustada katsesüsteemi, näit soojuse eraldumise tõttu (infrapuna-kiirgus).

Sobivaimaks tehisvalguse allikaks peetakse päikesevalgust järgiäärmavat „kunstlikku päikest”. „Kunstliku päikese” kiirguse intensiivsuse jaotumine pärast filtrimist peaks olema lähedane päikesevalguse omale vabas looduses (14). „Kunstliku päikesena” kasutatakse nii ksenoonkaarlampe kui (dopeeritud) elavhõbe-metallhalogeniid-kaarlampe (15). Viimaste eelis on nõrgem soojuskiirgus ja odavus, kuid nende valgus ei ole päikesevalgusega nii sarnane kui ksenoonkaarlampe oma. Kuna kõik „kunstlikud päikesed” kiirgavad palju UVBd, tuleks nende valgust filtrida, et vähendada ülimalt tsütotoksilist UVB-lainepikkusega kiirgust. Kuna rakukultuuri plastmaterjalid sisaldavad UV-stabiilisaatoreid, tuleks spektrit mõõta läbi 96 süvendiga plaadi kaane, mis on sama tüüpi kui analüüsis kasutatav. Sõltumata sellest, kas mõnd spektri osa nõrgendatakse filtrimise abil või seadmete vältimatu filtrimistoimega, ei tohiks pärast nende filtrite läbimist registreeritud spekter erineda standardsest päevavalgusest vabas looduses (14). Viidetes 8 ja 16 on näidatud „kunstliku päikese” filtritud kiirgusvoo spektraalne jaotus; sellist valgust kasutati 3T3 NRU fototoksilisuse *in vitro* katse valideerimisel. Vt ka lisa 2 joonist 1.

1.4.1.5.2. Kiiritusannuse määrtmine

Valguse intensiivsust (kiiritustihedust) tuleb regulaarselt kontrollida enne iga fototoksilisuse katset, kasutades sobivat lairiba-UV-mõõturit. Intensiivsust tuleb mõõta läbi sama tüüpi 96 süvendiga plaadi kaane, nagu kasutatakse analüüsis. UV-mõõtur peab olema kalibreeritud konkreetse allika järgi. UV-mõõturi mõõtmiskvaliteeti tuleb kontrollida ja selleks on soovitatav kasutada teist, võrdlus-UV-mõõturit, mis on sama tüüpi ja identselt kalibreeritud. Pikemate ajavahemike järel oleks väga hea kasutada spektrometriit valgusallika filtritud kiirguse spektri määrtmiseks ja lairiba-UV-mõõturi kalibreeringu kontrollimiseks.

On näidatud (6 ja 17), et annus 5 J/cm² (mõõdetud UVA piires) ei ole tsütotoksiline Balb/c 3T3 rakkude suhtes, kuid on piisav, et ergastada kemikaale ja kutsuda esile fototoksilisi reaktsioone; annuse 5 J/cm² saavutamiseks 50 minutiga kasutati kiiritustihedust 1,7 mW/cm². Vt lisa 2 joonist 2. Kui kasutatakse muud rakuliini või valgusallikat, tuleb kiiritusannus kalibreerida nii, et saaks valida kiiritusrežiimi, mis ei ole rakkude jaoks kahjulik, kuid on piisav standardfototoksiinide ergastamiseks. Valgusega kokkupuute aeg arvutatakse järgmiselt:

▼ B

$$t \text{ (min)} = \frac{\text{kiiritusannus (J/cm}^2\text{)} \times 1000}{\text{kiiritustihedus (mW/cm}^2\text{)} \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ Wsec})$$

1.4.2. Katsetingimused**1.4.2.1. Uuritava aine kontsentratsioon**

Annuse vahemiku määramise eelkatsetes määratakse uuritava aine kontsentratsiooni vahemik, mida kasutatakse kõnealuse aine toime uurimiseks valgustatud (+Irr) ja pimedas hoitud (–Irr) katsetes. Kuna lahustuvus võib aja jooksul või valgustamise ajal muutuda, võib olla kasulik hinnata lahustuvust katse alguses ja siis uuesti 60 minuti (või muu kasutatava töötlemisaja) pärast. Ebasobivate kasvutingimuste või liiga happeliste või aluseliste kemikaalide põhjustatud toksilisuse vältimiseks peab rakukultuuri pH pärast uuritava kemikaali lisamist jääma vahemikku 6,5–7,8.

Uuritava aine suurim kontsentratsioon peaks jääma füsioloogiliste katsetingimuste piiridesse, tuleks vältida rakkude osmootset või pH-stressi. Konkreetse uuritava kemikaali puhul võib osutada vajalikuks võtta arvesse muid füüsikalisi ja keemilisi omadusi, mis võivad piirata uuritava aine kontsentratsiooni suurendamist katsetes. Raskesti lahustuvate ainete puhul, mis ei ole kuni lahustuvuse piirini toksilised, tuleks uurida kõige kõrgemat kontsentratsiooni, mida on võimalik saavutada. Üldiselt ei tohiks uuritav kemikaal sadeneda ühelgi uuritaval kontsentratsioonil. Uuritava aine maksimaalne kontsentratsioon ei tohiks ületada 1 000 µg/ml; osmolaarsus ei tohiks olla suurem kui 10 mmol/l. Tuleks kasutada kaheksat lahust uuritava aine kontsentratsioonidega, mis moodustavad konstantse lahjendusteguriga geomeetrilise jada (vt punkti 2.1 teist lõiku).

Kui annuse vahemiku kindlakstegemise katse näitas, et uuritav kemikaal ei ole kuni kõrgeima kontsentratsioonini tsütotoksiline pimedas (–Irr), kuid on väga tsütotoksiline kiiritatuna (+Irr), võivad (+Irr) katseteks valitavad kontsentratsioonid erineda nendest, mis valitakse (–Irr) katseteks, et saadavad andmed oleksid nõutava kvaliteediga.

1.4.2.2. Kontrollkatsed**1.4.2.2.1. Rakkude kiirgustundlikkus: varasema arengu andmete kindlakstegemine:**

Rakkudel tuleb regulaarselt (umbes iga viienda passaaži järel) kontrollida tundlikkust valgusallika suhtes, hinnates nende elujõulisust pärast nende kokkupuudet suurenevate kiirgusdoosidega. Kõnealuse hindamise puhul tuleks kasutada mitut kiiritusannust, sealhulgas annuseid, mis on palju suuremad 3T3 NRU fototoksilisuse katses kasutatavatest. Nende dooside suurust on kõige kergem määrata valgusallika spektri UV-osade mõõtmistega. Rakud külvatakse tihedusel, mida kasutatakse *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katses, ja neid kiiritatakse järgmisel päeval. Rakkude elujõulisus määratakse veel üks päev hiljem neutraalpunase sidumise järgi. Tuleb tõendada, et tulemuseks saadud suurim mittetsütotoksiline annus (näiteks valideerimisel: 5 J/cm² [UVA]) oli piisav võrdluskemikaalide (tabel 1) õigeks klassifitseerimiseks.

▼B

1.4.2.2.2. Kiirgustundlikkus: jooksva katse kontroll

Katse vastab kvaliteedikriteeriumidele, kui kiiritatud negatiivsetes või lahusti kontrollproovides on rakkudel alles üle 80 % elujõulisest, võrrelduna mittekiiritatud negatiivsete või lahusti kontrollproovidega.

1.4.2.2.3. Lahusti kontrollproovide elujõulisus

Lahusti kontrollproovidest eraldatud neutraalpunase absoluutne optiline tihedus ($OD_{540 \text{ NRU}}$) näitab, kas igasse süvendisse külvatud 1×10^4 rakku on kasvanud normaalse kahekordistumisajaga analüüsi kahe päeva jooksul. Katse vastab nõuetekohasuse tingimustele, kui töötlemata kontrollide keskmine $OD_{540 \text{ NRU}}$ on $> 0,4$ (st umbes 20 korda suurem lahusti taustneeldumisest).

1.4.2.2.4. Positiivne kontrollproov

Teadaolevat fototoksilist kemikaali katsetatakse samaaegselt iga *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katsega. Selleks soovitatakse kloorpromasiini (CPZ). Standardeeskirja järgi *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katses uuritud CPZ puhul määrati järgmised katse nõuetekohasuse tingimused: kiiritatud (+Irr) CPZ: $IC_{50} = 0,1-2,0 \mu\text{g/ml}$, mittekiiritatud (-Irr) CPZ: $IC_{50} = 7,0-90,0 \mu\text{g/ml}$. Fotoärrituvustegur (PIF) peaks olema > 6 . Jälgida tuleks positiivse kontrolli varasemat tegemist.

Kloorpromasiini asemel võib samaaegsete positiivsete kontrollproovidenäna kasutada muid fototoksilisi kemikaale, mis kuuluvad uuritava kemikaaliga ühte kemikaalide klassi või on sarnase lahustuvusega.

1.4.3. **Katse käik (6–8, 16 ja 17):**1.4.3.1. *Esimene päev*

96 süvendiga koekultuuri mikrotiiterplaadi välimistesse süvenditesse kantakse 100 μl kasvukeskkonda (pimekatse). Ülejäänud süvenditesse kantakse 100 μl rakususpensiooni kontsentratsiooniga 1×10^5 rakku kasvukeskkonna milliliitris (see tähendab 1×10^4 rakku süvendi kohta). Uuritava aine iga kontsentratsiooniseeria jaoks ning lahusti- ja positiivse kontrolli jaoks tuleks ette valmistada kaks plaati.

Rakke inkubeeritakse 24 tunni jooksul (vt punkti 1.4.1.2), kuni need moodustavad pooleldi laatinud monokihi. Kõnealune inkubeerimisperiod võib võimaldab rakkudel taastuda, kinnituda põhjale ja eksponentsiaalselt kasvada.

1.4.3.2. *Teine päev*

Pärast inkubeerimist dekanteeritakse kasvukeskkond rakkudelt ja rakke pestakse hoolikalt 150 μl inkubeerimiseks kasutatud puhverlahusega. Lisatakse 100 μl puhverlahust, mis sisaldab vajalikku kontsentratsioonis uuritavat kemikaali või lahustit (lahustiga kontrollproov). Kasutatakse uuritava kemikaali 8 kontsentratsiooni. Rakke inkubeeritakse uuritava ainega pimedas 60 minutit (vt punkti 1.4.1.2 ja punkti 1.4.1.4 teist lõiku).

Kahest plaadist, mis on ette valmistatud uuritava aine iga kontsentratsiooni ja kontrollproovide seeria jaoks, valitakse üks, tavaliselt juhuslikkuse alusel, tsütotoksilisuse (-Irr) määramiseks (see on kontrollplaat) ja teine fototsütotoksilisuse (+Irr) määramiseks (uuritav plaat).

▼B

Katse +Irr-osa läbiviimiseks kiiritatakse rakke toatemperatuuril 50 minutit läbi 96 süvendiga plaadi kaane suurima kiiritusdoosiga, millel ei ole veel tsütotoksilist mõju (vt ka lisa 2). Kiiritamata plaate (–Irr) hoitakse toatemperatuuril 50 minutit (s.o kogu kiiritamise aja) pimedas kastis.

Katselahus dekanteeritakse ja rakke pestakse hoolikalt kaks korda 150 µl inkubeerimiseks kasutatud, kuid uuritavat ainet mitte sisaldava puhverlahusega. Puhverlahus asendatakse kasvukeskkonnaga ja inkubeeritakse (vt punkti 1.4.1.2) hommikuni (18–22 tundi).

1.4.3.3. *Kolmas päev*

1.4.3.3.1. Uurimine mikroskoobiga

Rakke vaadeldakse kasvu, morfoloogia ja monokihhi terviklikkuse hindamiseks faasikontrastmikroskoobiga. Märgitakse üles kõik muutused rakkude morfoloogias ja mõjud rakkude kasvule.

1.4.3.3.2. Neutraalpunase sidumise katse

Rakke pestakse 150 µl eelsoojendatud puhvriga. Pesemislahus eemaldatakse ettevaatliku koputamiseega. Lisatakse 100 µl neutraalpunase (3-amino-7-dimetüülamino-2-metüülfenasiinhüdrokloriid, EINECSi number 209-035-8; CASi number 553-24-2; C.I. 50040) lahust kontsentratsiooniga 50 µg/ml seerumit mittesisaldavas keskkonnas (16) ja inkubeeritakse 3 tundi, nagu on kirjeldatud punktis 1.4.1.2. Pärast inkubeerimist eemaldatakse neutraalpunase keskkond ja rakke pestakse 150 µl puhverlahusega. Liigne puhver dekanteeritakse ja eemaldatakse kuivatamise või tsentrifuugimisega.

Lisatakse täpselt 150 µl neutraalpunase desorbeerimislahust (mis on värskest valmistatud 49 osast veest, 50 osast etanoolist ja 1 osast äädikhapest).

Mikroitiiterplaati loksutatakse ettevaatlikult mikroitiiterplaadi loksutil 10 minutit, kuni neutraalpunane on väljunud rakkudest ja moodustanud homogeense lahuse.

Spektrofotomeetriga mõõdetakse neutraalpunase ekstrakti optiline tihedus 540 nm jumes, kasutades võrdlusena pimekatse süvendeid. Andmed salvestatakse sobivas elektroonilise faili formaadis edaspidiseks analüüsiks.

2. **ANDMED**

2.1. ANDMETE KVALITEET JA HULK

Katseandmete alusel peaks saama analüüsida kiiritatud ja kiiritamata proovides avaldunud mõju sõltuvust kontsentratsioonist ja võimaluse korral määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon, millel rakkude elujõulisus väheneb 50 % (IC₅₀). Tsütotoksilisuse esinemisel valitakse nii kontsentratsioonide vahemik kui ka üksikud kontsentratsioonid selliselt, et sõltuvust saaks sobitada katseandmetega.

Nii selgelt positiivsete kui ka selgelt negatiivsete tulemuste (vt punkti 2.3 esimest lõiku) puhul võib piisata esmasest katsest, millele on toeks üks või mitu annuste vahemiku määramiseks tehtud eelkatset.

▼B

Raskesti tõlgendatavat, piiripealset või ebaselget tulemust tuleks selgitada edasiste katsete abil (vt ka punkt 2.4 teine lõik). Sel juhul tuleks kaaluda katsetingimuste muutmist. Katsetingimustes võib muuta kontsentratsioone või nende intervalle, inkubeerimiseelset aega ja kiiritamisaega. Veels ebapüsivate kemikaalide puhul võib sobida lühem kokkupuuteaeg.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE

Andmete hindamise võimaldamiseks võib arvutada fotoärrituvustegur (*Photo-Irritation-Factor*, PIF) või keskmise fotoefekti (*Mean Photo Effect*, MPE).

Fototsütotoxilisuse näitajate arvutamiseks (vt allpool) on vaja lähendamiseks panna läbi kontsentratsiooni ja mõju määratud väärtuste mingi sobiv pidev kontsentratsiooni-mõju kõver (mudel). Kõvera sobitamine andmetega toimub tavaliselt mittelineaarse regressiooni meetodil (18). Selleks et hinnata, kuidas andmete varieerumus mõjutab sobitatud kõvera parameetreid, soovitatakse kasutada *bootstrap*-meetodit.

Fotoärrituvustegur (PIF) arvutatakse järgmise valemi abil:

$$\text{PIF} = \frac{\text{IC}_{50}(-\text{Irr})}{\text{IC}_{50}(+\text{Irr})}$$

Kui kiiritatud või kiiritamata proovides ei saa IC_{50} arvutada, siis ei saa katsematerjali PIFI määrata. Keskmise fotoefekt (MPE) põhineb täielike kontsentratsiooni-mõju sõltuvuste võrdlemisel (19). See on fotoefekti väärtuste esindusliku hulga kaalutud keskmine:

$$\text{MPE} = \frac{\sum_{i=1}^n w_i \text{PE}_{C_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

Fotoefekt PE_C igal kontsentratsioonil C on võrdne mõjuefekti RE_C ja annuseefekti DE_C korrutisega s.t $\text{PE}_C = \text{RE}_C \times \text{DE}_C$. Mõjuefekt RE_C on kiiritatud ja kiiritamata proovides avaldunud mõju vahe, s.t $\text{RE}_C = R_c(-\text{Irr}) - R_c(+\text{Irr})$. Annuseefekt leitakse järgmiselt:

$$\text{DE}_C = \left| \frac{C/C^* - 1}{C/C^* + 1} \right|$$

kus C^* on ekvivalentsuskontsentratsioon, s.o kontsentratsioon, mille puhul $+\text{Irr}$ -mõju võrdub $-\text{Irr}$ -mõjuga kontsentratsioonil C . Kui C^* ei ole võimalik määrata, kuna mõju väärtused $+\text{Irr}$ -kõveral on süstemaatiliselt kõrgemad või madalamad kui $R_c(-\text{Irr})$, loetakse annuseefekt võrdseks ühega. Kaalutegurid W_i on määratud kõrgeima mõju väärtusega, st $W_i = \text{MAX} \{R_i(+\text{Irr}), R_i(-\text{Irr})\}$. Kontsentratsioonide võrk C_i valitakse nii, et ühepalju punkte langeks igasse kontsentratsioonivahemikku, mis on määratud katses kasutatud kontsentratsiooni väärtustega. MPE arvutamine on piiratud maksimaalse kontsentratsiooni väärtusega, mille puhul vähemalt ühel kahest kõverast on veel näha vähemalt 10 %list mõju. Kui see maksimaalne kontsentratsioon on kõrgem kui $+\text{Irr}$ -katses kasutatud kõrgeim kontsentratsioon, loetakse $+\text{Irr}$ -kõvera ülejäänud osas mõju väärtus võrdseks nulliga. Sõltuvalt sellest, kas MPE väärtus on suurem kui nõuetekohaselt valitud piirväärtus ($\text{MPE}_c = 0,15$) või mitte, liigitatakse kemikaal fototoksiliseks.

▼B

Tarkvarapaketi PIF ja MPE arvutamiseks võib leida viite 20 veebilehel.

2.3. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Valideerimisuringu (8) põhjal võib öelda, et uuritava aine PIF < 2 või MPE < 0,1 puhul võib ennustada, et aine ei ole fototoksiline. Kui PIF > 2 ja < 5 või MPE > 0,1 ja < 0,15, siis on võimalik, et aine on fototoksiline; kui PIF > 5 või MPE > 0,15, siis võib ennustada, et aine on fototoksiline.

Igas laboris, kus seda analüüsi esmakordselt läbi viiakse, tuleks enne uuritavate ainete fototoksilisuse hindamisele asumist mõõta tabelis 1 osutatud etalonaineid. Leitavad PM või MPE väärtused peaksid olema lähedased tabelis 1 esitatud väärtustele.

Tabel 1

Keemiline nimetus	EINECSi nr	CASi nr	PIF	MPE	Neeldumismaksimum	Lahusti ⁽¹⁾
amiodaroon HCL	243-293-2	[19774-82-4]	> 3,25	0,27–0,54	242 nm 300 nm (õlg)	etanool
kloorpromasiin HCL	200-701-3	[69-09-0]	> 14,4	0,33–0,63	309 nm	etanool
norfloksatsiin	274-614-4	[70458-96-7]	> 71,6	0,34–0,90	316 nm	atsetonitriil
antratseen	204-371-1	[120-12-7]	> 18,5	0,19–0,81	356 nm	atsetonitriil
Dinaatriumprotoporfüriin IX	256-815-9	[50865-01-5]	> 45,3	0,54–0,74	402 nm	etanool
L-histidiin		[7006-35-1]	PIFi ei esine	0,05–0,10	211 nm	vesi
heksaklorofeen	200-733-8	[70-30-4]	1,1–1,7	0,00–0,05	299 nm 317 nm (õlg)	etanool
naatriumlaurüül-sulfaat	205-788-1	[151-21-3]	1,0–1,9	0,00–0,05	neeldumist ei esine	vesi

⁽¹⁾ Neeldumise mõõtmiseks kasutatav lahusti.

2.4. ANDMETE TÕLGENDAMINE

Kui fototoksiline mõju avaldub ainult kõige kõrgemal uuritud kontsentratsioonil (eriti vees lahustuvate uuritavate ainete puhul), tuleb ohu hindamisel lisaks arvestada veel muid asjaolusid. Nende hulka võivad kuuluda neeldumine nahas ja kemikaali kogunemine nahas ning muude katsete andmed, näiteks uuringud, kuidas kemikaal mõjub looma või inimese nahale *in vitro* või naha mudelitele.

▼B

Kui toksilisust ei ilmne (+Irr ja –Irr) ja kui halb lahustuvus ei luba uurida kõrgemaid kontsentratsioone, võib küsida, kas käesolev meetod sobib aine uurimiseks; sel juhul tuleb kaaluda kinnitavate uuringute läbiviimist, näiteks teise mudeliga.

3. **ARUANDLUS**

KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama vähemalt järgmist teavet.

Uuritav aine:

- andmed aine määramiseks, tavanimetused ning IUPACi ja CASi numbrid, kui need on teada;
- füüsikaline olek ja puhtus;
- uuringu tegemisel olulised füüsikalised-keemilised omadused;
- UV/nähtava valguse neeldumisspekter;
- stabiilsus ja fotostabiilsus, kui need on teada.

Lahusti:

- lahusti valiku põhjendus;
- uuritava kemikaali lahustuvus lahustis;
- lahusti protsendiline sisaldus töötlemiskeskkonnas.

Rakud:

- rakkude tüüp ja päritolu;
- mükoplasma puudumine;
- raku passaaži number, kui see on teada;
- rakkude kiirgustundlikkus, mis on määratud kiiritusseadmete abil, mida kasutatakse *in vitro* 3T3 NRU fototoksilisuse katses.

Katse tingimused (1): *inkubeerimine enne ja pärast töötlust*:

- kasvukeskkonna tüüp ja koostis;
- inkubeerimistingimused (CO₂ kontsentratsioon, temperatuur, niiskus);
- inkubeerimise kestus (enne töötlust, pärast töötlust).

Katse tingimused (2): *töötlemine kemikaaliga*:

- kiiritatud ja kiiritamata proovides kasutatud uuritava kemikaali kontsentratsioonide valiku põhjendus;
- uuritava kemikaali piiratud lahustuvuse ja tsütotoksilisuse puudumise puhul: kõrgeima uuritud kontsentratsiooni valiku põhjendus;
- töötlemiskeskkonna tüüp ja koostis (soolasisaldusega puhverlahus);
- kemikaaliga töötlemise kestus.

Katse tingimused (3): *kiiritamine*:

- kasutatud valgusallika – valiku põhjendus;

▼B

- valgusallika ja kiirgusmõõtja valmistaja ja tüüp;
- valgusallika kiirguse spektri näitajad;
- kasutatud filtri(te) läbilaskvuse ja neeldumise näitajad;
- kiirgusmõõtja iseloomustus ja kaliibrimise üksikasjad;
- valgusallika kaugus katsesüsteemist;
- UVA-kiirgus kõnealuse kauguse puhul, väljendatuna mW/cm^2 ;
- UV/nähtava valgusega kiiritamise kestus;
- UVA-annus (kiiritustihedus \times aeg), väljendatuna J/cm^2 ;
- rakukultuuride temperatuur kiiritamise ajal ja samaaegselt pimedas hoitud rakukultuuride temperatuur.

Katse tingimused (4): *elujõulisuse määramine neutraalpunase abil:*

- neutraalpunasega töötlemise keskkonna koostis;
- neutraalpunasega inkubeerimise kestus;
- inkubeerimistingimused (CO_2 kontsentratsioon, temperatuur, niiskus);
- neutraalpunase ekstraheerimise tingimused (ekstrahent; kestus);
- neutraalpunase optilise tiheduse spektrofotomeetriliseks määramiseks kasutatud lainepikkus;
- teine (võrdlus)lainepikkus, kui seda kasutati;
- mida kasutati spektrofotomeetrilise pimekatsena (kui kasutati).

Tulemused:

- rakkude mõõdetud elujõulisus uuritava kemikaali igal kontsentratsioonil, võrreldes samaaegsete lahustikontrollproovide keskmise elujõulisusega, protsentides;
- kontsentratsiooni-mõju sõltuvused (rakkude suhtelise elujõulisuse sõltuvus uuritava kemikaali kontsentratsioonist), mis on saadud samaaegsete +Irr- ja -Irr-katsetega;
- kontsentratsiooni-mõju sõltuvuste analüüs: võimaluse korral IC_{50} (+Irr) ja IC_{50} (-Irr) arvutamine;
- kiiritatud ja kiiritamata proovidest mõõdetud kahe kontsentratsiooni-mõju sõltuvuse võrdlus kas fotoärrituvusteguri (PIF) või keskmise fotoefekti (MPE) arvutamisega;
- katse nõuetekohasuse tingimused; samaaegsed lahustikontrollproovid;
- kiiritatud ja kiiritamata rakkude absoluutne elujõulisus (neutraalpunase ekstrakti optiline tihedus);
- varasemad negatiivsete ja lahustikontrollproovide andmed; keskvärtused ja standardhälbed;
- katse nõuetekohasuse tingimused; samaaegne positiivne kontrollproov;

▼B

— positiivse kontrollina kasutatud kemikaali IC₅₀ (+Irr) ja IC₅₀ (–Irr) ning PIF/MPE;

— varasemad andmed positiivse kontrolli kemikaali kohta: IC₅₀ (+Irr) ja IC₅₀ (–Irr) ja PIF/MPE; keskväärtused ja standardhälbed.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. **VIITED**

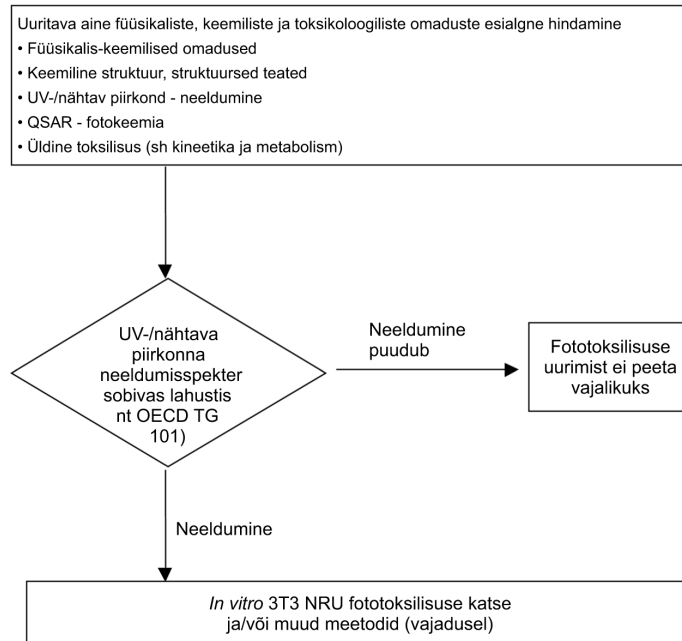
- 1) Lovell W.W. (1993). A scheme for *in vitro* screening of substances for photoallergenic potential. *Toxic. In Vitro* 7: 95–102.
- 2) Santamaria, L. and Prino, G. (1972). List of the photodynamic substances. In „Research Progress in Organic, Biological and Medicinal Chemistry” Vol. 3 part 1. North 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., Sabora, 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., Pfannenbecker, U., Potthast, J., De Silva, O., Steiling, W., and Willshaw, A. (1994). EEC/COLJPA 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 EÜ/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, a. 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 Illumination, Publication No. 90, Vienna, 1993, ISBN 3 900 734 275
- 16) ZEBET/ECVAM/COLIPA – Standard Operating Procedure: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Final Version, 7 September, 1998. 18 pgs.
- 17) Spielmann, H., Balls, M., Dupuis, J., Pape, W.J.W., De Silva, O., Holzhütter, H.G., Gerberick, F., Liebsch, M., Lovell, W.W., and Pfannenbecker, U. (1998) A study on UV filter chemicals from Annex VII of the European Union *Directive 76/768/EEC*, in the *in vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. *ATLA* 26, 679–708.
- 18) Holzhütter, H.G., and Quedenau, J. (1995) Mathematical modeling of cellular responses to external signals. *J. Biol. Systems* 3, 127–138.
- 19) Holzhütter, H.G. (1997). A general measure of *in vitro* phototoxicity derived from pairs of dose-response curves and its use for predicting the *in vivo* phototoxicity of chemicals. *ATLA*, 25, 445–462.
- 20) http://www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

▼B

1. Lisa

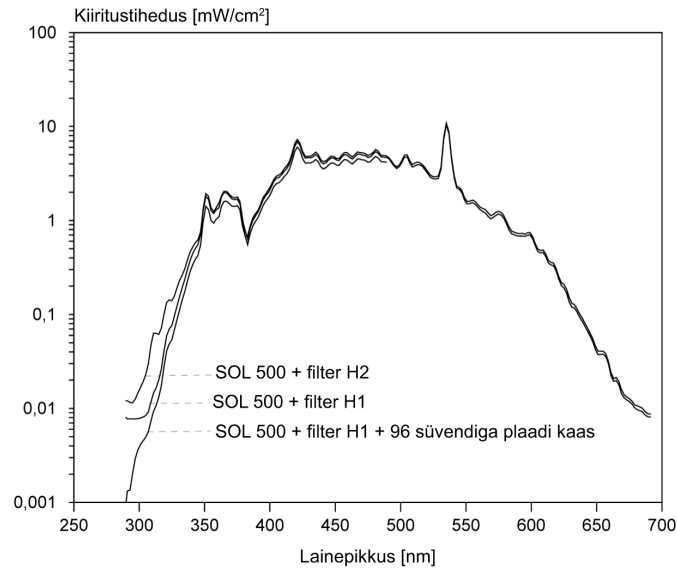
3T3 NRU PT osa kemikaalide fototoksilisuse uuringu jadakäsitlusel

▼B

2. Lisa

Joonis 1

„Kunstliku päikese” filtritud kiirgusvoo spektraaljaotus



(vt punkti 1.4.1.5 teist lõiku)

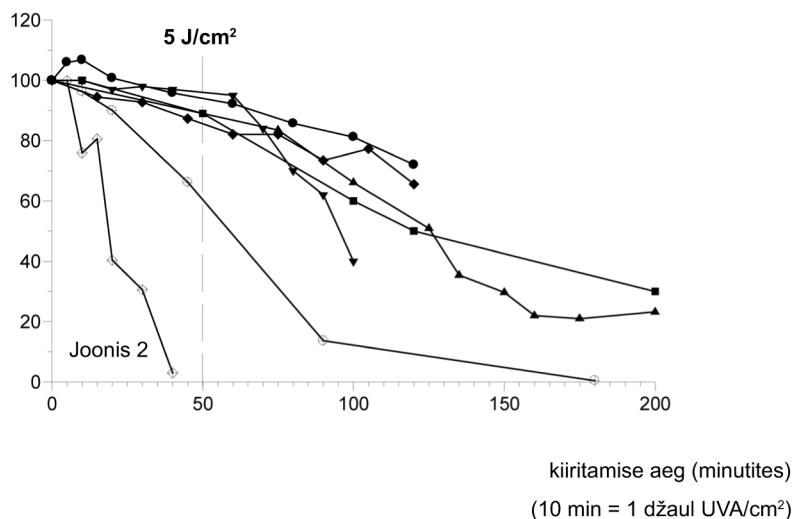
Joonisel 1 on esitatud näide, milline peaks olema „kunstliku päikese” filtritud kiirgusvoo spektraaljaotus. Valgusallikas on dopeeritud metallhalogeniidkaarlamp, mida kasutati 3T3 NRU fototoksilisuse määramise valideerimisel (6, 8, 17). Joonisel on näidatud kahe erineva filtri toime ja 96 sündiga rakukultuuri plaadi kaane täiendav filtriv toime. Filtrit H2 kasutati ainult katsesüsteemide puhul, mis taluvad suuremat hulka UVB kiirgust (nahamudeli test ja vere punaliblede foto-hemolüüsi test). 3T3 NRU fototoksilisuse katses kasutati filtrit H1. Jooniselt on näha, et plaadi kaane täiendav filtriv toime ilmneb peamiselt UVB kiirguse alas; siiski jääb kiirgusspektrisse piisavalt UVB kiirgust, et ergastada selliseid kemikaale nagu amidaroon, mille neeldumisspekter asub tavaliselt UVB kiirguse piirkonnas (vt tabelit 1).

▼B

Joonis 2

Balb/c 3T3 rakkude kiirgustundlikkus (mõõdetud UVA kiirguse alas)

Rakkude elujõulisus (neutraalpunase sidumise protsent kiiritamata kontrollproovides)



(vt punkti 1.4.1.5.2 teist lõiku ja punkte 1.4.2.2.1, 1.4.2.2.2)

Balb/c 3T3 rakkude tundlikkus 3T3 NRU fototoksilisuse katse valideerimisel kasutatud „kunstliku päikesega” kiiritamise suhtes, mõõdetuna UVA piirkonnas. Joonisel on näidatud seitsmes laboris saadud valideerimiseelsed tulemused (1). Kaks valgete sümbolitega sõltuvust saadi vananenud rakkudega (palju passaaže), need rakud tuli asendada uute varurakkudega; mustade sümbolitega sõltuvused iseloomustavad rakke, kelle kiirgustaluvus on lubatud piirides.

Nendest andmetest määrati kõrgeim mittetsütotoksiline kiirgusdoos 5 J/cm². Vertikaalne katkendjoon näitab lisaks maksimaalset kiirgustaluvust, mida käsitletakse punktis 1.4.2.2.

▼M3

B.42. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÕLMEDE KATSE

SISSEJUHATUS

1. OECD kemikaalide katsetamise juhendeid ja nendel põhinevaid ELi katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Varem on vastu võetud originaalkatsemeetod hiire naha sensibiliseerimise määramiseks lokaalsete lümfisõlme katsega (*Local Lymph Node Assay* – LLNA; OECD katsejuhend 429; käesoleva lisa peatükk B.42) (1). Kirjanduses on avaldatud LLNA valideerimise üksikasjad ja ülevaade sellega seotud töödest (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11). Ajakohastatud LLNA põhineb katse- ja teaduslike andmete hindamisel (12). See on teine katsemeetod, mis on kavandatud selleks, et hinnata katseloomadel kemikaalide (ainete ja segude) võimet sensibiliseerida nahka. Teise meetodi puhul (OECD katsejuhend 406, käesoleva lisa peatükk B.6) kasutatakse merisigu, nimelt merisigade maksimeerimise katset ja Buehleri katset (13). LLNA-1 on B.6 ja OECD katsejuhendiga 406 (13) võrreldes loomade healuga seotud eeliseid. Käesolev LLNA juhend hõlmab tulemuslikkusnäideteid (1. liide), mida võib kasutada selliste uute ja/või modifitseeritud katsemeetodite valideerimisolukorra hindamiseks, mis on tööpõhimõttelt ja teostuslikult sarnased LLNaga, vastavalt OECD katsejuhendi nr 34 (14) põhimõtetele.

2. LLNaga uuritakse naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ja saadakse kvantitatiivseid andmeid immuunvastuse annusest sõltuvuse hindamiseks. Tuleb märkida, et pehmed/mõõdukad sensibiliseerijad, mida soovitatakse sobivate positiivse kontrolli kemikaalidena merisigade katsemeetodite jaoks (need on B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13), sobivad kasutamiseks ka LLNA puhul (6, 8, 15). Vähendatud LLNAd, mille puhul kasutatakse kuni 40 % vähem loomi, on kirjeldatud ühe võimalusena ka käesolevas katsemeetodis (16, 17, 18). Vähendatud LLNAd võib kasutada, kui on regulatiivne vajadus kinnitada naha sensibiliseerimise võime negatiivset ennustust; seejuures tuleb järgida kõiki muid LLNA katse-eeskirja üksikasju, nagu on kirjeldatud käesolevas katsemeetodis. Negatiivse tulemuse ennustus peab põhinema kogu kättesaadaval teabel, nagu on kirjeldatud punktis 4. Enne vähendatud LLNA lähenemisviisi kohaldamist tuleb esitada selged põhjendused ja selle meetodi kasutamise teaduslik alus. Kui vähendatud LLNaga saadakse positiivne või kaheti tõlgendatav tulemus, võib vaja minna lisakatseid tulemuste tõlgendamiseks või selgitamiseks. Vähendatud LLNAd ei tohiks kasutada ainete naha sensibiliseeriva toime ohu uurimiseks sellisel juhul, kui on vaja teavet annuse-immuunvastuse seose kohta, näiteks alakategooriatesse klassifitseerimiseks vastavalt määrusele (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist, ning ÜRO ühtsele ülemaailmsele kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemile.

MÕISTED

3. Kasutatud mõisted on esitatud 2. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. LLNA on alternatiivne meetod võimalike naha sensibiliseerivate kemikaalide kindlakstegemiseks. See ei tähenda tingimata, et kõikidel juhtudel tuleks kasutada merisigadega tehtavate katsete (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13) asemel LLNAd, vaid pigem, et uuring on sama hea ja seda võib kasutada alternatiivina, mille positiivsed või negatiivsed tulemused üldiselt ei vaja täiendavat kinnitamist. Katselabor võtab arvesse kogu uuritava aine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave hõlmab aine

▼ M3

nimetust ja keemilist struktuuri, füüsikalis-keemilisi omadusi, muude ainetega *in vitro* või *in vivo* tehtud toksilisuskatsete tulemusi ja struktuurilt samalaadsete ainete toksikoloogilisi andmeid. Osutatud teavet tuleb analüüsida, et määrata kindlaks, kas LLNA sobib kõnealuse aine puhul (arvestades LLNA sobimatust teatavate piiratud kemikaalitüüpide puhul, vt punkt 5) ning valida sobivad annused.

- LLNA on *in vivo* meetod ja seetõttu ei lõpeta see loomade kasutamist naha allergilise sensibiliseerimise hindamisel. Siiski võimaldab see vähendada selleks vajalike loomade arvu. Lisaks võimaldab LLNA oluliselt parandada viisi, kuidas loomi kasutatakse naha allergilise sensibiliseerimise määramiseks (vähem tekitatakse valu ja kannatusi). LLNA põhineb sellel, et uuritakse kemikaalide immunoloogilist mõju sensibiliseerimise induktsioonifaasi ajal. Erinevalt merisigadega tehtavatest katsetest (s.o B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13) ei eelda LLNA, et naha ärritamisega tekitataks ülitundlikkusreaktsioonid. Samuti ei eelda LLNA adjuvandi kasutamist, nagu seda tehakse merisigadega tehtava maksimeerimiskatse puhul (13). Seega vähendab LLNA loomadele valu ja kannatuste tekitamist. Hoolimata LLNA eelistest B.6 või OECD katsejuhendi 406 kohaste katsetega võrreldes tuleks tunnustada, et on teatud piirangud, mis võivad tingida B.6 või OECD katsejuhendi 406 (13) kohaste katsete kasutamise (nt LLNA valenegatiivid teatavate metallide puhul, valepositiivid teatavate nahaärritajate puhul (näiteks teatavat tüüpi pindaktiivsed kemikaalid) (19, 20) või probleemid uuritavate ainete lahustuvusega). Lisaks võib teatavate kemikaaliklasside või selliste ainete puhul, mis sisaldavad segavat toimet avaldada võivaid funktsionaalseid rühmi (21), olla vaja kasutada meriseakatsed (B.6 või OECD katsejuhend 406) (13). Kuna valideerimise andmebaas oli piiratud (eelkõige uuriti pestitsiidivorme), võib LLNA tõenäolisemalt kui meriseakatsed anda positiivse tulemuse sellist tüüpi uuritava aine puhul (22). Vormide uurimisel tuleks kaaluda seda, et võrdlusainena lisatakse samalaadseid aineid, mille tulemused on teada, et tõendada LLNaga saadavate tulemuste õigsust (vt punkt 16). Selliste teadaolevate piirangute arvestamisega peaks LLNA olema kohaldatav igasuguste ainete uurimiseks, millel ei ole omadusi, mis võiksid mõjutada LLNaga saadavate tulemuste õigsust.

KATSE PÕHIMÕTE

- LLNA põhimõte seisneb selles, et sensibilisaatorid kutsuvad esile lümfotsüütide vohamise lähimates lümfisõlmedes, mis dreenevad uuritava aine pealekandmise paika. Vohamine on võrdeline pealekantud allergeeni annuse ja allergiatekitamisvõimega ning see võimaldab lihtsa meetodiga sensibiliseerimist kvantitatiivselt mõõta. Vohamist mõõdetakse nii, et keskmist vohamist igas katserühmas võrreldakse keskmise vohamisega kandeaine-kontrollrühmas, mille liikmeid on töödeldud üksnes kandeainega (*vehicle treated control* – VC). Määratakse igas uuritava ainega töödeldud rühmas leitud keskmise vohamise ja paralleelselt kontrollrühmas leitud keskmise vohamise suhtarv, mida nimetatakse stimulatsiooniindeksiks (SI); SI peab olema vähemalt 3 selleks, et uuritava aine võiks klassifitseerida võimalikuks naha sensibiliseerijaks. Siin kirjeldatud meetodid põhinevad radioaktiivse märgise kasutamisel *in vivo*; selle meetodiga mõõdetakse vohavate rakkude arvu suurenemist kõrvaletta dreenevates lümfisõlmedes. Kuid vohavate rakkude arvu hindamiseks võib kasutada ka muid väljundeid tingimusel, et need täielikult vastavad tulemuslikkusnõuetele (1. liide).

▼M3**KATSE KIRJELDUS****Loomaliigi valimine**

7. Käesoleva katse jaoks valitud liik on hiir. Kasutatakse CBA/Ca või CBA/J liini noori täiskasvanud emashiiri, kes ei ole poeginud ega tiined. Katse alguses peaksid loomad olema 8–12 nädalat vanad ning loomade kehamassi varieerumine peaks olema minimaalne ja mitte ületama 20 % keskmisest massist. Võib kasutada ka muid liine ja isasloomi, kui on olemas piisavalt andmeid selle tõendamiseks, et LLNA immuunvastuses ei ole olulisi liini- ja/või soospetsiifilisi erinevusi.

Pidamis- ja söötmingimused

8. Hiiri tuleks pidada rühmapuurides (23), kui ei esitata nõuetekohast teaduslikku põhjendust üksikpuuris pidamise kasuks. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapärasest labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata.

Loomade ettevalmistamine

9. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks (kuid mitte kõrvamärkidega) ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise algust, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega. Enne katse alustamist uuritakse kõiki loomi, et neil ei oleks nähtavaid nahakahjustusi.

Annustamislahuste valmistamine

10. Tahke uuritav aine tuleb lahustada või suspenderida lahustis või kandeaines ja vajaduse korral lahjendada enne hiire kõrvalestale määrimist. Vedelaid kemikaale võib annustada puhtal kujul või lahjendada enne annustamist. Lahustumatuid keemilisi aineid, näiteks aineid, mida kasutatakse meditsiiniseadmetes, tuleb enne hiire kõrvalestale kandmist sobiva solvendiga tõhusalt ekstraheerida, et teha kindlaks kõik ekstraheeritavad koostisained, mille mõju tuleks uurida. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

Usaldusvärsuse kontroll

11. Positiivse kontrolli kemikaale kasutatakse selleks, et tõendada katsemeetodi vajalikku tulemuslikkust: sensibiliseerivate uuritavate ainetega, mille puhul immuunvastuse ulatus on hästi kirjeldatud, saadakse õige ja korratav tulemus. Soovitatakse teha paralleelselt positiivse kontrolli katse, kuna see tõendab labori võimet teha iga katse õigesti ning võimaldab hinnata laborisest ja laboritevahelist korratavust ja võrreldavust. Ka mõned reguleerivad asutused nõuavad positiivset kontrolli iga uuringu puhul ja seepärast soovitatakse käesoleva meetodi kasutajatel konsulteerida enne LLNA tegemist asjakohaste asutustega. Seepärast soovitatakse alati teha paralleelselt positiivse kontrolli katseid, et vältida vajadust teha täiendavaid loomkatseid, et täita nõudeid, mis võivad tekkida perioodilise positiivse kontrolli kasutamise puhul (vt punkt 12). Positiivne kontroll peaks andma positiivse LLNA immuunvastuse kokkupuutetasemel, mis eeldatavasti suurendab stimulatsiooniindeksit (SI) üle kolme korra, võrreldes negatiivse kontrollrühmaga. Positiivse kontrolli annus tuleks valida nii, et see ei põhjustaks ulatuslikku nahaärritust või süsteemset mürgitust ja tekitatav mõju oleks

▼M3

korratav, kuid mitte liiga suur (näiteks stimulatsiooniindeks üle 20 on liiga suur). Eelistatavad positiivse kontrolli ained on 25 % heksüülkaneelaldehüüd (Chemical Abstracts Service'i (CASi) nr 101-86-0) atsetooni-oliiviõli segus (4: 1, v/v) ja 5 % merkaptobensotiasool (CASi nr 149-30-4) *N,N*-dimetüülformamiidis (vt 1. liide, tabel 1). Võib olla olukordi, kus piisavalt põhjendatult võib kasutada muid positiivse kontrolli aineid, mis vastavad eespool esitatud kriteeriumidele.

12. Kuigi igas katses soovitatakse paralleelselt teha katsed ka positiivse kontrolli rühmaga, võib esineda olukordi, kus labori jaoks, milles korrapäraselt (st vähemalt kord kuus) tehakse LLNA-d ja on olemas varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaas, mis tõendab labori võimet saada korratavaid ja õigeid positiivse kontrolli tulemusi, võib sobiv olla perioodiline positiivse kontrolli tegemine (näiteks kuni kuue kuu järel). Vajalikku oskuste taset LLNA alal võib tõendada vähemalt kümne sõltumatu ja omavahel kooskõlas oleva positiivse kontrolli katsega, mis on tehtud mõistliku ajavahe miku (vähem kui aasta) jooksul.
13. Paralleelset positiivse kontrolli rühma tuleb alati kasutada siis, kui muutub LLNA läbiviimine (näiteks uued väljaõppe saanud töötajad, katsemeetodi materjalide ja/või reaktiivide muutus, katsemeetodi läbiviimise tehniliste vahendite muutus, uus katseloomade tarnija) ja sellised muutused tuleb laboriprotokollis dokumenteerida. Tuleb analüüsida selliste muutuste mõju varasemate katsetega loodud andmebaasi järjepidevusele ja otsustada, kas on vaja teha uus andmebaas, et dokumenteerida kooskõla varasemate positiivse kontrolli tulemustega.
14. Meetodi kasutajad peaksid teadma, et otsus kasutada positiivset kontrolli perioodiliselt, mitte paralleelselt, mõjutab perioodilise positiivse kontrolli vahepealsel ajal ilma positiivse kontrollita saadud negatiivsete uuringutulemuste adekvaatsust ja vastuvõetavust. Kui perioodilise positiivse kontrolli katses saadakse näiteks valenegatiiv, võib ajavahemikus viimasest vastuvõetavast positiivse kontrolli katsest kuni vastuvõetamatu kontrollkatsemi uuritavate ainetega saadud negatiivsed tulemused panna kahtluse alla. Selliste tulemuste tähendust tuleks hoolikalt analüüsida, kui otsustatakse, kas teha positiivse kontrolli katseid paralleelselt või üksnes perioodiliselt. Mõelda tuleb ka, kuidas kasutada vähem loomi paralleelses positiivse kontrolli rühmas, kui see on teaduslikult põhjendatud ja kui labor tõendab oma varasemate andmetega, et on võimalik kasutada vähem hiiri (12).
15. Kuigi positiivset kontrollainet tuleks uurida kandaines, mis teatavasti annab teatava kindla immuunvastuse (nt atsetoon-oliiviõli, suhtes 4: 1, v/v), võib esineda teatavaid regulatiivseid olukordi, milles on vaja teha katseid ka ebatavalise kandainega (kliiniliselt või keemiliselt asjakohane segu) (24). Kui paralleelset positiivse kontrolli katset tehakse muu kandainega kui uuritava aine puhul, on vaja moodustada eraldi veel positiivse kontrolli kandaine-kontrollrühm.
16. Kui uuritakse teatava keemiliste ühendite klassi aineid või mõõdetakse nende poolt esile kutsutava immuunvastuse vahemikku, võib olla kasulik mõõta teatavaid võrdlusaineid, millega tõendatakse, et katse võimaldab õigesti määrata kõnealuste ühenditüüpide võimet nahka sensibiliseerida. Sobival võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused:

— struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega;

— teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused;

— varasemad toetavad LLNA andmed;

— toetavad andmed muude katseloomade ja/või inimese kohta.

▼M3

KATSE KÄIK

Loomade arv ja annusemäärad

17. Ühes annuserühmas on vähemalt neli looma, kasutatakse vähemalt kolme uuritava aine kontsentratsiooni ja paralleelselt negatiivset kontrollrühma, keda töödeldakse üksnes kandeainega, mida kasutatakse uuritava aine puhul, ning positiivse kontrolli rühma (kas paralleelne või hiljutine positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–14). Tuleb kaaluda positiivse kontrolli tegemist mitme annusega, eriti kui positiivset kontrolli tehakse aeg-ajalt. Kontrollrühma loomi koheldakse ja töödeldakse nii nagu katserühma loomi, välja arvatud töötlemine uuritava ainega.
18. Annuse ja kandeaine valik peaks põhinema viidetes 3 ja 5 antud soovitudel. Tavaliselt valitakse järjestikused annused sobivast kontsentratsioonide reast, näiteks 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. Kasutatava kontsentratsioonide rea valimisel peaks olema asjakohane teaduslik põhjendus. Tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad toksikoloogiaandmed (nt ägeda toksilisuse ja nahaärrituse kohta) ning andmed uuritava aine struktuuri ja füüsikalise-keemiliste omaduste kohta ning valida kolm järjestikust kontsentratsiooni nii, et kõrgeim kontsentratsioon tagab maksimaalse võimaliku kokkupuute, kuid selle puhul ei avaldu süsteemset toksilisust ega liiga suurt paikset nahaärritust (3, 25). Sellise teabe puudumisel võib olla vajalik teha esialgne sõelkatse (vt punktid 21–24).
19. Kandeaine ei tohiks segada katse tegemist ega muuta katse tulemust ja tuleks valida nii, et viia lahustuvus maksimumini, et kasutada kõrgeimat võimalikku kontsentratsiooni ja saada ühtlasi uuritava aine pealekandmiseks sobiv lahus või suspensioon. Soovitavad kandeained on atsetoon-oliiviõli (4: 1, v/v), *N,N*-dimetüülformamiid, metüüleetüülketoon, propüleenglükool ja dimetüülsulfoksiid (19), kuid võib kasutada ka muid kandeaineid, kui esitada selleks piisav teaduslik põhjendus. Teatud olukorras võib osutada vajalikuks kasutada täiendavaks kontrolliks kliiniliselt asjakohast lahustit või kaubanduslikku valmistist, milles uuritavat ainet turustatakse. Tuleks jälgida, et hüdofiilsed uuritavad ained kantaks peale kandeainesüsteemi abil, mis märgab nahka ega voola nahalt kohe maha; selleks lisatakse sobivaid solubiliseerijaid (nt 1 % Pluronic® L92). Seepärast tuleks täielikku vesilahust vältida.
20. Iga üksiku hiire lümfisõlmede töötlemine võimaldab hinnata loomadevahelist varieeruvust ja statistiliselt võrrelda uuritavate ainetega tehtud mõõtmiste ja kandeaine-kontrollrühma mõõtmiste erinevust (vt punkt 35). Lisaks saab positiivse kontrolli rühma hiirte arvu vähendamise võimalikkust hinnata siis, kui kogutakse iga üksiku hiire andmeid (12). Lisaks nõuavad mõned reguleerivad asutused iga üksiku looma andmete kogumist. Mõned reguleerivad asutused peavad vastuvõetavaks katseloomade koondandmeid ja siis võivad meetodi kasutajad valida, kas koguda iga üksiku looma andmeid või koondandmeid

Esialgne sõelkatse

21. Kui ei ole andmeid suurima uuritava annuse kindlaksmääramiseks (vt punkt 18), tuleks teha esialgne sõelkatse, et leida LLNA jaoks sobiv annuste vahemik. Esialgse sõelkatse eesmärk on saada andmeid, mille järgi määrata suurim LLNA põhikatses kasutatav annus, kui ei ole teada kontsentratsioon, millel avaldub süsteemne toksilisus (vt punkt 24) ja/või tekib ülemäärane nahaärritus (vt punkt 23). Suurim uuritav annus peab olema 100 % vedela uuritava aine puhul või kõrgeim võimalik kontsentratsioon tahke aine või suspensiooni puhul.

▼M3

22. Esialgne sõelkatse tehakse samades tingimustes kui LLNA põhikatse, kuid ei hinnata lümfisõlmede vohamist ja annuserühma kohta võidakse kasutada vähem katseloomi. Annuserühmas on soovitatavalt üks või kaks hiirt. Kõiki hiiri vaadeldakse iga päev, et leida süsteemse toksilisuse kliinilisi ilminguid või paikset nahaärritust pealekandmiskohas. Registreeritakse kehakaal enne katset ja enne katse lõppu (6. päev). Iga hiire kumbagi kõrvalesta uuritakse punetuse suhtes ja hinnatakse selle aste, kasutades tabelit 1 (25). Kõrvalesta paksust mõõdetakse paksusemõõtja (nt digitaalne mikromeeter või paksusemõõtja Peacock Dial) abil 1. päeval (enne annustamist), 3. päeval (ligikaudu 48 tundi pärast esimest annust) ja 6. päeval. Lisaks võib 6. päeval mõõta kõrvalesta paksuse, milleks pärast looma humaanset surmamist lüüakse kõrvalestast mulgustajaga välja tükk ja kaalutakse. Ulatuslikku paikset nahaärritust näitab vähemalt hindele 3 vastav punetus ja/või kõrvalesta paksuse suurenemine vähemalt 25 % mõnel mõõtmispäeval (26, 27). LLNA põhikatse jaoks valitud kõrgeim annus on järgmine madalam annus esialgse sõelkatse kontsentratsioonide reas (vt punkt 18), millel ei avaldu süsteemne toksilisus ega teki ülemäärast nahaärritust.

Tabel 1
Punetuse hinne

Nähud	Hinne
Nahapunetust ei esine	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus	1
Selgesti nähtav nahapunetus	2
Mõõdukas kuni tugev nahapunetus	3
Tugev nahapunetus (meenutab peeti) kuni kooriku tekkimine, mis takistab nahapunetuse astme edasist täpsustamist	4

23. Lisaks kõrvalesta paksuse 25 % suurenemisele (26, 27) on ärritust tekitavate ainete kindlakstegemiseks LLNA abil kasutatud ka kõrvalesta paksuse statistiliselt olulist suurenemist töödeldud hiirte, võrreldes kontrollrühma hiirtega (28, 29, 30, 31, 32, 33, 34). Ent kuigi statistiliselt oluline kõrvalesta paksuse suurenemine võib olla ka väiksem kui 25 %, ei ole selline paksuse suurenemine konkreetselt seotud ülemäärase nahaärritusega (30, 32, 33, 34).

24. Kui kliinilisi uuringuid kasutatakse LLNA põhikatses kasutatava suurima annuse hindamise osana, siis süsteemset toksilisust (35, 36) võivad näidata järgmised kliinilised tunnused: närvisüsteemi talitluse muutused (nt karva püstitõusmine, liigutuste koordinatsiooni kadu, värin ja krambid), käitumise muutused (nt agressiivsus, muutus oma karvkatte hooldamises, liikumisaktiivsuse oluline muutus), hingamise muutused (s.o hingamissageduse ja -sügavuse muutused, nagu raskendatud hingamine, õhuhmimine, räginad) ning muutused toidu ja vee tarbimises. Lisaks tuleb hindamisel arvestada letargia ja/või mittereageerimise märke ning rohkem kui kerge või lühiajalise valu või ebamugavustunde kliinilisi tunnuseid, samuti rohkem kui 5 % kehakaalu vähenemist ajavahemikus 1. kuni 6. päevani ning suremust. Suremas olevad loomad ja loomad, kes ilmselt kannatavad valu või kellel ilmnevad tõsiste või kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaanselt surmata (37).

▼M3

Põhiuuringu katse ajakava

25. Katse ajakava on järgmine.

- 1. päev: määratakse iga üksiku looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Kummagi kõrvalesta välisküljele kantakse 25 µl sobivaltlahjendatud uuritavat ainet, üksnes kandeainet või positiivse kontrolli ainet (paralleelne või perioodiline positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15).
- 2. ja 3. päev: korratakse 1. päeval tehtud pealekandmist.
- 4. ja 5. päev: loomi ei töödelda.
- 6. päev: registreeritakse iga looma mass. Igale katse- ja kontrollrühma hiirele süstitakse sabaveeni kaudu 250 µl fosfaatpuhvriga soolalahust, mis sisaldab 20 µCi ($7,4 \times 10^5$ Bq) tritiumiga märgistatud ^3H -metüültümidini. Asendusvõimalusena süstitakse kõikidele hiirtele sabaveeni kaudu 250 µl fosfaatpuhvriga soolalahust, mis sisaldab 2 µCi ($7,4 \times 10^4$ Bq) ^{125}I -jododesoksüüridiini ja 10^{-5} M fluorodesoksüüridiini. Viis tundi hiljem loomad surmatakse humaanselt. Igal katseloomal lõigatakse välja kumbagi kõrvalesta drenivad lümfisõlmed ja töödeldakse neid koos fosfaatpuhvriga soolalahuses (üksiku katselooma lähenemisviis); asendusvõimalusena lõigatakse välja iga katseloomade rühma loomade kumbagi kõrvalesta drenivad lümfisõlmed ja pannakse need kõik koos fosfaatpuhvriga soolalahusesse (iga katserühma ühendatud proovide lähenemisviis). Lümfisõlmede leidmise ja väljalõikamise üksikasjad ja joonised on esitatud viites (12). Paiksete naha immuunvastuste edasiseks jälgimiseks põhikatses võib katseprotokolli kanda ka täiendavad näitajad, nagu kõrvalesta punetuse hinnang või kõrvalesta paksuse mõõtmise andmed (mis saadakse kas paksusemõõtjaga või pärast surmamist kõrvalestast mulgustajaga välja löödud tüki massi mõõtmisega).

Rakuspensioonide valmistamine

26. Valmistatakse iga üksiku looma mõlemalt poolt (üksiku katselooma lähenemisviis) või katserühma loomadelt (katserühma ühendatud proovide lähenemisviis) välja lõigatud ühendatud lümfisõlmede üksikrakuspensioon, milleks rakud eraldatakse üksteisest ettevaatliku mehaanilise töötlemisega, filtrides läbi 200 µm avaga roostevabast terasest võrgu, või kasutatakse muud sobivat võtet üksikrakuspensiooni valmistamiseks. Lümfisõlme-rakke pestakse kaks korda suure koguse fosfaatpuhvriga soolalahusega ja sadestatakse DNA 5 % trikloroäädikhappega 4 °C juures 18 tunni jooksul (3). Põhja tsentrifuugitud sade kas suspendeeritakse uuesti 1 ml trikloroäädikhappes ja kantakse 10 ml stsintillatsioonivedelikku sisaldavasse stsintillatsioonipudelisse ^3H -loendamiseks või pannakse otse gammaloenduri torru ^{125}I -loendamiseks.

Rakkude vohamise määramine imendunud radioaktiivsuse järgi

27. ^3H -metüültümidini imendumist mõõdetakse β -stsintillatsiooni loendamise teel lagunemiste arvuna minutis (*disintegrations per minute*, DPM). ^{125}I -jododesoksüüridiini imendumist mõõdetakse ^{125}I -loendamise teel ning väljendatakse samuti lagunemiste arvuna minutis. Sõltuvalt kasutatavast lähenemisviisist väljendatakse radioaktiivse märgise imendumist DPM-ides katselooma kohta (üksiku katselooma lähenemisviis) või DPM-ides katserühma kohta (katserühma ühendatud proovide lähenemisviis).

Vähendatud LLNA

28. Teatud juhtudel, kui on regulatiivne vajadus kinnitada, et aine ei sensibi-seeri nahka, võib valikuliselt kasutada vähendatud LLNA eeskirja (16, 17, 18), milleks kulub vähem katseloomi; seejuures tuleb järgida kõiki käesolevas katsemeetodis kirjeldatud muid LLNA katse-eeskirja üksikasju. Enne vähendatud LLNA lähenemisviisi kohaldamist tuleb esitada selged põhjendused ja selle meetodi kasutamise teaduslik alus. Kui saadakse positiivne või kaheti tõlgendatav tulemus, võib vaja minna lisakatseid tulemuste tõlgendamiseks või selgitamiseks.

▼ **M3**

29. Ainus erinevus LLNA ja vähendatud LLNA katse-eeskirjade vahel on vähendatud annuserühmade arv ja seepärast ei saada vähendatud LLNaga teavet immuunvastuse annusest sõltuvuse kohta. Seepärast ei saa vähendatud LLNAd kasutada, kui on vaja teavet immuunvastuse annusest sõltuvuse kohta. Nagu paljuannuselise LLNA puhul, nii ka vähendatud LLNA puhul peaks uuritava aine kontsentratsioon olema kõrgeim kontsentratsioon, millel ei avaldu selge süsteemne toksilisus hiire jaoks ega ülemäärane paikne nahaärritus (vt punkt 18).

TÄHELEPANEKUD**Kliinilised tähelepanekud**

30. Vähemalt kord päevas tuleks igal loomal hoolikalt vaadelda kliiniliste tunnuste esinemist – kas annustamiskoha paikset ärritust või süsteemset toksilisust. Iga hiire kohta registreeritakse süstemaatiliselt kõik tähelepanekud. Jälgimiskavas tuleks ette näha kriteeriumid, mille alusel tehakse kiiresti kindlaks ja surmatakse valutult hiired, kellel avaldub süsteemne toksilisus, ülemäärane paikne nahaärritus või -söövitus (37).

Kehamass

31. Vastavalt punktile 25 tuleks mõõta iga looma kehamass katse alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist.

TULEMUSTE ARVUTAMINE

32. Iga katserühma tulemused väljendatakse stimulatsiooniindeksi (SI) kaudu. Üksiku katselooma lähenemisviisi puhul tuletatakse SI, jagades iga uuritava aine rühma ja positiivse kontrollrühma keskmise DPMi hiire kohta lahusti-/kandeaine-kontrollrühma keskmise DPM-iga hiire kohta. Keskmise SI kandeaine-kontrollrühmade puhul on seega 1. Katserühma ühendatud proovide lähenemisviisi korral saadakse SI, jagades iga katserühma ühendatud radioaktiivsuse imendumise ühendatud kandeaine-kontrollrühma imendumisega; selle tulemuseks on keskmine SI.
33. Otsustamisel peetakse tulemust positiivseks, kui SI on vähemalt 3. Kuid piiripealse tulemuse positiivseks leiuks kuulutamise otsuse tegemisel võib kasutada ka annuse-immuunvastuse sõltuvuse tugevust, statistilist olulisust ja lahusti/kandeaine ning positiivse kontrolli tulemuste kooskõllalisust (4, 5, 6).
34. Kui saadud tulemust on vaja selgitada, tuleks arvesse võtta uuritava aine omadusi, sealhulgas struktuurilist sarnasust teadaolevate naha sensibilisaatoritega, omadust põhjustada hiirel tugevat paikset nahaärritust ning annuse-immuunvastuse sõltuvuse laadi. Neid ja muid kaalutlusi on arutatud üksikasjalikult viites 7.
35. Radioaktiivsuseandmete kogumine üksiku hiire tasandil võimaldab statistiliselt analüüsida, kas andmetes on näha annuse-immuunvastuse vahelist sõltuvust ja kui tugev see on. Iga statistiline hindamine peaks hõlmama annuse-immuunvastuse sõltuvuse hindamist ja katserühmade läbimõeldud võrdlemist (näiteks paariviisiline annuserühmade ja paralleelsete kandeaine-kontrollrühmade võrdlemine). Statistiline analüüs võib hõlmata näiteks lineaarset regressiooni või Williami testi annuse-immuunvastuse sõltuvuste hindamiseks ja Dunnetti paariviisiliste võrdluste testi. Statistilise analüüsi sobiva meetodi valimisel peaks uurija kogu aeg arvesse võtma võimalikku dispersioonide ebavõrdsust ja muid seonduvaid probleeme, mille tõttu võib vaja minna andmete teisendamist või mittepameetrilist statistilist analüüsi. Igal juhul võib uurijal olla vaja teha SI arvutusi ja statistilist analüüsi kõigi andmepunktidega ja siis mõne andmepunkti kõrvalajamisega (nn võõrväärtused).

▼ M3**ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmed**

36. Andmed tuleb koondada tabelisse. Üksiku katselooma lähenemisviisi puhul esitatakse üksiklooma DPMi väärtus, rühma keskmine suhte DPM/katseloom väärtus, selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ja iga annuserühma keskmine SI, võrrelduna paralleelse kandeaine-kontrollrühma SI-ga. Katsesrühma ühendatud proovide lähenemisviisi korral esitage keskmine DPM / mediaan-DPM ja keskmine SI iga annuserühma jaoks, võrrelduna paralleelse kandeaine-kontrollrühma SI-ga.

Katseprotokoll

37. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave:

uuritav aine ja kontrollaine:

- tunnusandmed (näiteks CASi ja EÜ numbrid, kui on teada; allikas; puhtus; teadaolevad lisandid; partii number);
- füüsikaline laad ja füüsikalise-keemilised omadused (nt lenduvus, stabiilsus, lahustuvus);
- kui tegemist on seguga, selle koostis ja koostisosade suhtelised protsendimäärad;

lahusti/kandeaine:

- tunnusandmed (puhtus; kontsentratsioon (vajaduse korral); kasutatud ruumala);
- kandeaine valiku põhjendus;

katseloomad:

- CBA-liini hiirte allikas;
- loomade mikrobioloogiline staatus, kui see on teada;
- loomade arv ja vanus;
- loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

katsetingimused:

- uuritava aine ettevalmistamise ja annustamise üksikasjad;
- annuse valiku põhjendus (sealhulgas esialgse sõelkatse tulemused, kui see tehti);
- kandeaine ja uuritava aine kontsentratsioonid ning uuritava aine manustatud üldkogus;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);
- annustamis- ja proovivõtukava üksikasjalik kirjeldus;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- kriteeriumid, mille järgi uuringutulemus loeti positiivseks või negatiivseks;
- kõikide katse-eeskirjast kõrvalekaldumiste üksikasjad ja selgitus, kuidas kõrvalekaldumine mõjutab uuringu korraldust ja tulemusi;

usaldusväarsuse kontroll:

- kokkuvõtte viimase usaldusväarsuskontrolli tulemustest, sealhulgas teave kasutatud aine, kontsentratsiooni ja kandeaine kohta;
- katselabori paralleelselt saadud ja/või varasemad positiivse kontrolli ja negatiivse kontrolli andmed;

▼ M3

- kui paralleelset positiivse kontrolli katset ei tehtud, siis kõige viimase korrapärase positiivse kontrolli uuringu kuupäev ja laboriprotokoll ning aruanne, milles esitatakse labori varasemad positiivse kontrolli andmed, mis põhjendavad paralleelse positiivse kontrolli katse tegematajätmist;

tulemused:

- iga looma mass annustamise alguses ja pärast ettemääratud surmamist; samuti iga katserühma keskvaartus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga);
- iga looma puhul toksilisuse ilmnemise algus ja nähud, sealhulgas võimalik nahaärritus annustamiskohas;
- iga katserühma DPMi väärtused ja SI väärtused tabelina iga üksiku hiire kohta (üksiku katselooma lähenemisviisi) või keskvaartus/mediaan (katserühma ühendatud proovide lähenemisviisi);
- iga katserühma DPMi/hiire keskvaartus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ning iga katserühma võõrväärtuste analüüsi tulemused üksiku katselooma lähenemisviisi puhul;
- arvutatud SI ja sobiv hajuvuse näitaja, millega võetakse arvesse eri loomadega saadud tulemuste hajuvust uuritava aine rühmas ja kontrollrühmas üksiku katselooma lähenemisviisi puhul;
- annuse-immuunvastuse sõltuvus;
- vajaduse korral statistilised analüüsid;

tulemuste arutelu:

- lühike kommentaar tulemuste, annuse-immuunvastuse sõltuvuse analüüsi ja vajaduse korral statistilise analüüsi kohta ning järeldused selle kohta, kas uuritud ainet tuleks pidada naha sensibilisaatoriks.

KIRJANDUS

- 1) OECD (2002), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. OECD Guideline for the Testing of Chemicals No 429, Paris. Vt <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- 2) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992), The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary, *Food Chem. Toxicol.*, 30, 165–169.
- 3) Kimber, I., Dearman, R.J., Scholes, E.W. and Basketter, D.A. (1994), The local lymph node assay: developments and applications, *Toxicol.*, 93, 13–31.
- 4) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise, *J. Toxicol. Environ. Health*, 53, 563–79.
- 5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999–1002.
- 6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985–997.
- 7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests, *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327–33.

▼ M3

- 8) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins, *Toxicol.*, 146, 49–59.
- 9) Dean, J.H., Twerdok, L.E., Tice, R.R., Sailstad, D.M., Hattan, D.G., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: II. Conclusions and recommendations of an independent scientific peer review panel, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 258–273.
- 10) Haneke, K.E., Tice, R.R., Carson, B.L., Margolin, B.H., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: III. Data analyses completed by the national toxicology program interagency center for the evaluation of alternative toxicological methods, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34, 274–286.
- 11) Sailstad, D.M., Hattan, D., Hill, R.N., Stokes, W.S. (2001), ICCVAM evaluation of the murine local lymph node assay: I. The ICCVAM review process, *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 34: 249–257.
- 12) ICCVAM (2009), Recommended Performance Standards: Murine Local Lymph Node Assay, NIH Publication Number 09-7357, Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt 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. Vt <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. Vt <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. Vt http://ecvam.jrc.it/ft_doc/E-SAC26_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. Vt <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. Vt 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. Vt <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. Vt 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. Vt <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/fcLLNA/BRDcomplete.pdf>
- 28) Hayes, B.B., Gerber, P.C., Griffey, S.S. and Meade, B.J. (1998), Contact hypersensitivity to dicyclohexylcarbodiimide and diisopropylcarbodiimide in female B6C3F1 mice, *Drug. Chem. Toxicol.*, 21, 195-206.
- 29) Homey, B., von Schilling, C., Blumel, J., Schuppe, H.C., Ruzicka, T., Ahr, H.J., Lehmann, P. and Vohr, V.W. (1998), An integrated model for the differentiation of chemical-induced allergic and irritant skin reactions, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 153, 83-94.
- 30) Woolhiser, M.R., Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1998), A combined murine local lymph node and irritancy assay to predict sensitisation and irritancy potential of chemicals, *Toxicol. Meth.*, 8, 245-256.
- 31) Hayes, B.B. and Meade, B.J. (1999), Contact sensitivity to selected acrylate compounds in B6C3F1 mice: relative potency, cross reactivity, and comparison of test methods, *Drug. Chem. Toxicol.*, 22, 491-506.
- 32) Ehling, G., Hecht, M., Heusener, A., Huesler, J., Gamer, A.O., van Loveren, H., Maurer, T., Riecke, K., Ullmann, L., Ulrich, P., Vandebriel, R. and Vohr, H.W. (2005), A European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: first round. *Toxicol.*, 212, 60-68.
- 33) Vohr, H.W. and Ahr, H.J. (2005), The local lymph node assay being too sensitive? *Arch. Toxicol.*, 79, 721-728.
- 34) Patterson, R.M., Noga, E. and Germolec, D. (2007), Lack of evidence for contact sensitisation by Pfiesteria extract, *Environ. Health Perspect.*, 115, 1023-1028.
- 35) OECD (1987), *Acute Dermal Toxicity*, OECD Guideline for Testing of Chemicals No 402, Paris, France. Vt <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. Vt http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute/tox/Tox_workshop.htm
- 37) OECD (2000), *Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation*, Environmental Health and Safety Monograph, Series on Testing and Assessment No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris. Vt <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

▼M3

1. liide

Naha sensibiliseerimise määramiseks pakutava samalaadse või muudetud LLNA katsemeetodi tulemuslikkusnõuded

SISSEJUHATUS

1. Tulemuslikkusnõuete eesmärk on esitada alus, mille põhjal uusi katsemeetodeid, nii kaitstud (autoriõiguse või kaubamärgiga või registreeritud) meetodeid kui ka kaitsemata meetodeid, saaks tunnistada konkreetse uuringu jaoks piisava täpsuse ja usaldusväärsusega meetodiks. Selliseid valideeritud ja tunnustatud meetoditel põhinevaid tulemuslikkusnõudeid saab kasutada selleks, et hinnata muude samalaadsete, samadele teaduslikele põhimõtetele tuginevate ja samade bioloogiliste või toksiliste mõjude mõõtmiseks või ennustamiseks kasutatavate, nn mina-kah-meetodite usaldusväärsust ja täpsust (14).
2. Enne muudetud meetodi, s.o kinnitatud meetodi võimaliku täiustatud variandi vastuvõtmist peaks toimuma hindamine, et teha kindlaks kavandatud muudatuste mõju katse tulemuslikkusele ja millisel määral sellised muudatused mõjutavad teavet muude valideerimisprotsessi osade kohta. Olenevalt pakutavate muudatuste arvust ja laadist, muudatuste kohta saadud andmetest ja muudatusi toetavatest dokumentidest tuleks nende suhtes kohaldada kas sama valideerimisprotsessi kui uue katsemeetodi puhul või usaldusväärsuse ja asjakohasuse piiratud hindamist kehtestatud tulemuslikkusnõuete alusel (14).
3. Käesoleva katsemeetodi alusel kavandatud ja kasutamiseks esitatud menetlusi tuleks hinnata, et määrata kindlaks nende usaldusväärsus ja täpsus kõikide ainete puhul, mis esindavad kogu LLNA hinneteskaalat. Katseloomade põhjendamatu kasutamise vältimiseks soovitatakse tungivalt, et mudelite väljatöötajad peaksid nõu asjaomaste asutustega, enne kui alustavad käesolevas katsemeetodis esitatud tulemuslikkusnõuete ja suuniste kohaseid valideerimisuuringuid.
4. Tulemuslikkusnõuded põhinevad USA alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (US-ICCVAM), alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskuse (EC-ECVAM) ja alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskuse (JaCVAM) ühtlustatud tulemuslikkusnõuetel (12), mille alusel hinnatakse LLNA samalaadsete või muudetud versioonide valideeritust. Tulemuslikkusnõuded koosnevad katsemeetodite olulisematest osadest, soovitatavatest võrdluskemikaalidest ning täpsus- ja usaldatavusnõuetest, millele pakutav meetod peaks vastama või mida ta peaks ületama.

I. Katsemeetodi olulised osad

5. Samalaadse või muudetud LLNA-meetodi tööpõhimõttelise ja teostusliku analoogia tagamiseks LLNAga ning sama bioloogilise mõju mõõtmiseks peaksid katse-eeskirjas olema järgmised osad:

— uuritavat ainet tuleks paikselt kanda hiire mõlemale kõrvalestale;

— tuleks mõõta lümfotsüütide vohamist lümfisõlmedes, mis dreenevad uuritava aine pealekandmise kohta;

— lümfotsüütide vohamist tuleks mõõta naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ajal;

▼ **M3**

- uuritavate ainete puhul peaks valitav annus olema kõrgeim kontsentratsioon, millel ei avaldu hiire jaoks süsteemne toksilisus ega ülemäärane paikne nahaärritus. Positiivsete võrdluskemikaalide puhul peaks suurim annus olema vähemalt sama suur kui asjaomase võrdluskemikaali EC3 väärtus LLNA puhul (vt tabel 1), mille puhul ei avaldu hiire jaoks süsteemne toksilisus ega ülemäärane paikne nahaärritus;
- igas uuringus peaks olema paralleelne kandeaine-kontrollrühm ja vajaduse korral ka positiivse kontrolli rühm;
- igas annuserühmas tuleks kasutada vähemalt nelja katselooma;
- võib koguda andmeid kas üksiku katselooma kohta või katseloomade ühendatud andmeid.

Kui mõni neist kriteeriumidest ei ole täidetud, ei saa siin esitatud tulemuslikkusnõudeid kasutada samalaadse või muudetud meetodi valideerimiseks.

II. Võrdluskemikaalide miinimumloetelu

6. US-ICCVAMi, EC-ECVAMi ja JaCVAMi ühtlustatud tulemuslikkusnõuetes (12) on esitatud 18 võrdluskemikaali kui miinimumhulk, mida tuleks kasutada, ja neli valikulist võrdluskemikaali (need on ained, mis andsid LLNaga kas valepositiivne või -negatiivne, kui võrrelda neid inimesel ja meriseal saadud tulemustega (B.6 ehk OECD katsejuhend 406) (13), ning seepärast võimaldavad need näidata LLNaga võrreldavat või paremat tulemuslikkust), mis on võetud LLNA tulemuslikkusnõuetesse. Osutatud kemikaalide väljalimise kriteeriumid olid järgmised:
 - võrdluskemikaalide loendis on esindatud aineklassid, mida tavaliselt uuritakse naha sensibiliseerimise suhtes ja mille immuunvastus on vahemikus, mida LLNaga saab mõõta või ennustada;
 - kõigi ainete keemiline ehitus on hästi teada;
 - iga aine jaoks on olemas meriseal saadud LLNA andmed (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13) ning (kus võimalik) inimesel saadud andmed ning
 - kõik ained on kaubanduses hästi kättesaadavad.

Soovitatud võrdluskemikaalid on loetletud tabelis 1. Uuringutes, milles soovitatud võrdluskemikaale kasutatakse, tuleks hindamiseks kasutada võrdluskemikaale samades kandeainetes, millega need on loetletud tabelis 1. Kui mõnda loetletud ainet ei ole saada, võib kasutada muid aineid, mis vastavad loetletud valikukriteeriumidele, ja tuleb esitada vajalik põhjendus.

Tabel 1

LLNA tulemuslikkusnõuete jaoks soovitatud võrdluskemikaalid

Jrk-nr	Kemikaal ⁽¹⁾	CASi nr	Vorm	Veh ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x – 2,0x EC3	Tegelik EC3 vahemik	LLNA vs GP	LLNA vs inimene
1	5-kloro-2-metüül-4-isotiasoliin-3-oon (CMI)/2-metüül-4-isotiasoliin-3-oon (MI) ⁽⁵⁾	26172-55-4/2682-20-4	Liq	DMF	0,009	1	0,0045–0,018	NC	+/+	+/+
2	DNCB	97-00-7	Sol	AOO	0,049	15	0,025–0,099	0,02–0,09-4	+/+	+/+
3	4-fenüleendiamiin	106-50-3	Sol	AOO	0,11	6	0,055–0,22	0,07–0,16	+/+	+/+
4	koobalkloriid	7646-79-9	Sol	DMSO	0,6	2	0,3–1,2	0,4–0,8	+/+	+/+
5	isoeugenool	97-54-1	Liq	AOO	1,5	47	0,77–3,1	0,5–3,3	+/+	+/+
6	2-merkaptobensotiasool	149-30-4	Sol	DMF	1,7	1	0,85–3,4	NC	+/+	+/+
7	tsitraal	5392-40-5	Liq	AOO	9,2	6	4,6–18,3	5,1–13	+/+	+/+
8	HCA	101-86-0	Liq	AOO	9,7	21	4,8–19,5	4,4–14,7	+/+	+/+
9	eugenool	97-53-0	Liq	AOO	10,1	11	5,05–20,2	4,9–15	+/+	+/+
10	fenüülbensoaat	93-99-2	Sol	AOO	13,6	3	6,8–27,2	1,2–20	+/+	+/+
11	kaneelalkohol	104-54-1	Sol	AOO	21	1	10,5–42	NC	+/+	+/+
12	imidasolidinüülkarbamiid	39236-46-9	Sol	DMF	24	1	12–48	NC	+/+	+/+
13	metüülmetakrülaad	80-62-6	Liq	AOO	90	1	45–100	NC	+/+	+/+
14	klorobenseen	108-90-7	Liq	AOO	25	1	NA	NA	-/-	-/ (*)
15	isopropanool	67-63-0	Liq	AOO	50	1	NA	NA	-/-	-/+

▼ M3

Jrk-nr	Kemikaal ⁽¹⁾	CASi nr	Vorm	Veh ⁽²⁾	EC3 % ⁽³⁾	N ⁽⁴⁾	0,5x – 2,0x EC3	Tegelik EC3 vahemik	LLNA vs GP	LLNA vs inimene
16	piimhape	50-21-5	Liq	DMSO	25	1	NA	NA	–/–	–/ (*)
17	metüülsaltsülaat	119-36-8	Liq	AOO	20	9	NA	NA	–/–	–/–
18	salitsüülhape	69-72-7	Sol	AOO	25	1	NA	NA	–/–	–/–

Valikained, millega saab võrrelda LLNaga võrreldes paremat tulemuslikkust

19	naatriumlaurüülsulfaat	151-21-3	Sol	DMF	8,1	5	4,05–16,2	1,5–17,1	+/–	+/–
20	etüleenglükoolidimetakrülaat	97-90-5	Liq	MEK	28	1	14–56	NC	+/–	+/+
21	ksüleen	1330-20-7	Liq	AOO	95,8	1	47,9–100	NC	+/ (**)	+/–
22	nikkeldikloriid	7718-54–9	Sol	DMSO	5	2	NA	NA	–/+	–/+

Lühendid: AOO = atsetoon; oliiviõli (4: 1, v/v); CASi nr = Chemical Abstracts Service'i number; DMF = *N,N*-dimetüülformamiid; DMSO = dimetüülsulfoksiid; DNCB = 2,4-dinitroklorobenseen; EC3 = hinnanguline kontsentratsioon, mille puhul stimulatsiooniindeks on 3; GP = merisea katse tulemus (s.o B.6 või OECD katsejuhik 406) (13); HCA = heksüülkaneelaldehüüd; Liq = vedelik; LLNA = hiire paiksete lümfisõlmede katse tulemus (s.o B.42 või OECD katsejuhik 429) (1); MEK = metüületüülketoon; NA = ei ole kohaldatav, kuna stimulatsiooniindeks on väiksem kui 3; NC = ei ole arvatud, kuna andmed on saadud üheainsa uuringuga; Sol = tahke aine; Veh = kandeaine.

(*) Oletatakse, et inimese puhul ei ole sensibilisaator, kuna inimnaha tükikese katsete kliinilisi tulemusi ei ole leitud, kõnealust ainet ei ole inimnaha tükikese allergeenide kompleksis ja ei ole teatatud ühestki juhtumist, kus aine oleks sensibiliseerinud inimest.

(**) Merisea andmed ei ole kättesaadavad.

⁽¹⁾ Kemikaalid tuleks valmistada iga päev, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

⁽²⁾ Kuna LLNA tulemuslikkust võib mõjutada erinev kandeaine, tuleb kasutada iga võrdluskemikaali jaoks soovitatud kandeainet (24, 32).

⁽³⁾ Keskväärts, kui kättesaadav on rohkem kui üks EC3 väärtus. Negatiivsete ainete (st mille stimulatsiooniindeks on väiksem kui 3) puhul on esitatud kõrgeim uuritud kontsentratsioon.

⁽⁴⁾ Andmete allikana kasutatud LLNA uuringute arv.

⁽⁵⁾ Kaubanduses kättesaadav nimetus Kathon CG all (CASi nr 55965-84/9), mis on CMI ja MI segu vahekorras 3: 1. Komponentide suhtelised kontsentratsioonid on vahemikus 1,1–1,25 % CMI ja 0,3–0,45 % MI. Inaktiivsed komponendid on magneesiumisoolad (21,5–24 %) ja vasknitraat (0,15–0,17 %), ülejäänud osa on vesi (74–77 %). Kathon CGd saab osta Sigma-Aldrichi ning Rohm and Haas'i (nüüd Dow Chemical Corporation) kaudu.

▼ **M3****III. Kindlaksmääratud usaldusväärsus- ja täpsusnõuded**

7. Samalaadse või muudetud LLNA-meetodi täpsus peaks vastama 18 kohustuslikult kasutatava võrdluskemikaali puhul LLNA tulemuslikkusnõuetele või ületama LLNA täpsust. Uus või muudetud meetod peaks võimaldama õige klassifitseerimise jah-või-ei-otsuse alusel. Kuid uus või muudetud meetod ei tarvitse võimaldada õigesti klassifitseerida kõiki kohustuslikku miinimumkogumisse kuuluvaid võrdluskemikaale. Kui näiteks üks nõrkadest sensibiliseerijatest klassifitseeritakse valesti, tuleks samaväärsuse tulemuslikkuse tõendamiseks kaaluda vale klassifitseerimise põhjenduse ja sobivate lisaandmete esitamist (näiteks katsetulemused, millega saadakse õige klassifikatsioon muude ainete puhul, mille füüsilised, keemilised ja sensibiliseerivad omadused samanevad valesti klassifitseeritud aine omadega). Sellisel juhul hinnatakse uue või muudetud LLNA-meetodi valideerituse staatust konkreetsete juhtude alusel.

Laborisisene reprodutseeritavus

8. Laborisisese reprodutseeritavuse määramiseks tuleks uut või muudetud LLNA-meetodit hinnata, kasutades sensibiliseerivat ainet, mida on LLNA-meetodiga hästi uuritud. Seepärast on LLNA tulemuslikkusnõuete saavutamise hindamisel aluseks heksüülkaneelaldehüüdi (HCA) korduva mõõtmise tulemuste varieeruvus. Laborisisese usaldusväärsete hindamiseks tuleb saada HCA hinnangulise lävikoktsentratsiooni (ECt) väärtused neljast eraldi katsest, mis tehakse vähemalt nädalase vahega katsete vahel. Laborisisene reprodutseeritavus on vastuvõetav, kui laboris suudetakse iga HCA katse puhul saada ECt väärtused vahemikus 5–20 %, mis vastab 10 % HCA jaoks LLNaga kindlaks tehtud EC3 vahemikule poolest keskvaärtusest kuni kahekordse keskvaärtuseni (vt tabel 1).

Laboritevaheline reprodutseeritavus

9. Laboritevahelise reprodutseeritavuse määramiseks tuleks uut või muudetud LLNA-meetodit hinnata, kasutades kahte sensibiliseerivat ainet, mida on LLNA-meetodiga hästi uuritud. LLNA tulemuslikkusnõuete saavutamise hindamisel on aluseks HCA ja 2,4-dinitroklorobenseeni (DNCB) mõõtmise tulemuste varieeruvus eri laborites. ECt väärtused tuleks määrata sõltumatult ühest uuringust, mis tehakse vähemalt kolmes eri laboris. Vastuvõetava laboritevahelise reprodutseeritavuse tõendamiseks peaks iga labor saama HCA puhul ECt väärtused vahemikus 5–20 % ja DNCB puhul vahemikus 0,025–0,1 %, mis vastab kindlakstehtud EC3 vahemikule poolest keskvaärtusest kuni kahekordse keskvaärtuseni; LLNaga määratud keskvaärtus on HCA puhul 10 % ja DNCB puhul 0,05 % (vt tabel 1).

▼ **M3**

2. liide

Mõisted

Täpsus: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (14).

Võrdlusaine: sensibiliseeriv või muu aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalised-keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusoo soovitas immuunvastuse tugevuse vahemikus.

Hinnanguline lävikkontsentratsioon (ECT): uuritava aine hinnanguline kontsentratsioon, mis põhjustab sellise stimulatsiooniindeksi, mis tõendab positiivse immuunvastuse olemasolu.

Hinnanguline SI 3 kontsentratsioon (EC3): uuritava aine hinnanguline kontsentratsioon, mille puhul stimulatsiooniindeks on kolm.

Valenegatiiv: uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud negatiivseks või toimetuks, kui see tegelikult on positiivne või sensibiliseeriva toimega.

Valepositiiv: uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud positiivseks või sensibiliseerivat toimet omavaks, kui see tegelikult on negatiivne või sensibiliseeriva toimeteta.

Oht: kahjustava tervise- või ökoloogilise mõju võimalikkus. Kahjustav mõju avaldub üksnes piisaval tasemel kokkupuute puhul.

Laboritevaheline reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad erinevad kvalifitseeritud laborid, kasutades sama katse-eeskirja ja uurides samu uuritavaid aineid, saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelsete ja valideerimisega seotud menetlustega ja see näitab, millisel määral võib uurimismeetodit edukalt üle viia ühest laborist teise (14).

Laborisisene reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad konkreetset katse-eeskirja kasutades saada kordusuuringutes eri aegadel samasuguseid tulemusi (14).

Mina-kah-meetod: kõnekeelne väljend katsemeetodi kohta, mis on struktuuriliselt ja tööpõhimõttelt sarnane valideeritud ja aktsepteeritud võrdlusmeetodiga. Sellist katsemeetodit võib valideerida kiirendatud korras (*catch-up validation*). Kasutatakse vaheldumisi samalaadsete katsemeetodite puhul (14).

Võõrväärtus: võõrväärtus on katsetulemus, mis oluliselt erineb populatsiooni juhuvalimi muudest väärtustest.

Tulemuslikkusnõuded: valideeritud katsemeetodil põhinevad nõuded, mille alusel hinnatakse, kui võrd saab esitatud katsemeetodit võrrelda tööpõhimõttelt ja teostuslikult sarnase meetodiga. Arvesse võetakse järgmist: i) katsemeetodi olulised osad; ii) valideeritud standardmeetodi tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulga valitud võrdluskemikaalide miinimumloend ja iii) võrreldavad täpsuse ja usaldusväärsuse tasemed, mis põhinevad valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustel ja mis tuleks kavandatud katsemeetodi hindamisel saavutada võrdluskemikaalide miinimumloendi kasutamisel (14).

Kaitstud katsemeetod: katsemeetod, mille kasutamine ja levitamine on piiratud patente, autoriõiguse, kaubamärgi vm sellisega.

▼ M3

Kvaliteedi tagamine: juhtimisprotsess, mille puhul katsete tegemises osalevatest isikutest sõltumatud isikud hindavad labori katsestandarditest, nõuetest ja tegevuse registreerimise korra kinnipidamist ning andmeedastuse õigsust.

Võrdluskemikaalid: valideerimisel kasutamiseks välja valitud kemikaalid, mille esilekutsutavad immuunvastused *in vitro* või *in vivo* võrdlussüsteemis või huvipakkuva loomaliigi puhul on juba teada. Sellised kemikaalid peaksid esindama kemikaaliklasse, mille ainete puhul katsemeetodit eeldatavalt kasutatakse, ja samuti selliste ainete põhjustatava immuunvastuse kogu vahemikku, tugevast mõjust nõrga mõjuni ja mõju puudumiseni. Valideerimise eri staadiumide jaoks, samuti eri katsemeetodite ja kasutusalaade puhul võidakse nõuda võrdluskemikaalide eri kogumite kasutamist (14).

Asjakohasus: mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat efekti, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, millisel määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist efekti. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi õigsuse (sisulise kooskõlalise) kaalutlusi (14).

Usaldusvärsus: mõiste, mis iseloomustab katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusvärsuse hindamiseks arvutatakse laborisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (14).

Naha sensibiliseerimine: immunoloogiline protsess, mis avaldub, kui tundlik olend viiakse paikselt kokkupuutesse keemilise allergeeniga, mis kutsub esile naha immuunvastuse, mis võib areneda kontaktsensibiliseerimiseks.

Stimulatsiooniindeks (SI): arvutatud väärtus, mis näitab uuritava aine võimet tekitada naha sensibiliseerimist ning mis on töödeldud rühmades ja paralleelselt uuritud kandeaine-kontrollrühmas jälgitud lümfotsüütide vohamise näitajate suhtarv.

Uuritav aine (uuritav kemikaal): iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valideeritud katsemeetod: katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusvärsus konkreetse eesmärgi puhul. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusvärsuse osas, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi puhul (14).



B.43. NEUROTOKSILISUSE UURING NÄRILISTEL

1. MEETOD

Käesolev meetod on samaväärne OECD TG 424ga (1997).

Käesolev katsemeetod on välja töötatud sellise teabe saamiseks, mis on vajalik kemikaalide võimaliku neurotoksilisuse kinnitamiseks või täiendavaks iseloomustamiseks täiskasvanud loomadel. Seda saab kombineerida olemasolevate, korduva annusega toksilisuse uuringute katsemeetoditega või sooritatakse eraldi uuringuna. On soovitatav, et OECD neurotoksilisuse uurimise strateegiaid ja meetodeid käsitleva juhisdokumendi (1) osas peetaks nõu, et aidata välja töötada käesoleval katsemeetodil põhinevaid uuringuid. See on eriti tähtis siis, kui võetakse arvesse käesoleva meetodi rutiinseks kasutamiseks soovitatud vaatluste ja katsemenetluste muudatusi. Juhisdokument on koostatud, et hõlbustada muude, teatavates olukordades kasutatavate katsemenetluste valikut.

Käesoleva meetodi abil ei hinnata arenguga seotud neurotoksilisust.

1.1 SISSEJUHATUS

Kemikaalide toksiliste omaduste hindamisel on oluline arvesse võtta võimalikke neurotoksilisi mõjusid. Juba korduvate annustega süsteemset toksilisust uuriv katsemeetod hõlmab vaatlusi, mis skriinivad võimalikku neurotoksilisust. Käesolevat katsemeetodit võib kasutada sellise uuringu väljatöötamiseks, mille abil saadakse lisateavet või kinnitust täheldatud neurotoksiliste mõjude kohta korduva annusega süsteemse toksilisuse uuringutes. Kemikaalide teatavate klasside võimaliku neurotoksilisuse arvessevõtmine võib viidata sellele, et neid võib sobivamalt hinnata, kasutades meetodid ilma eelnevalt korduva annusega neurotoksilisuse uuringutest saadud võimalike neurotoksilisuse märkideta. Selliste kaalutluste hulka kuuluvad nt:

- neuroloogiliste märkide või neuropatoloogiliste kahjustuste jälginine muudes toksilisuse uuringutes kui korduva annusega süsteemse toksilisuse uuringud või
- struktuuriline samalaadsus või muu teave, mis seob kemikaalid tuntud neurotoksiliste ainetega.

Lisaks sellele võib olla muid näiteid, kui käesoleva katsemeetodi kasutamine on vajalik, vt täiendavad üksikasjad viites (1).

Käesolev meetod on välja töötatud selliselt, et seda saab kohandada vastavalt erilistele vajadustele, mis kinnitavad kemikaalide teatavat histopatoloogilist ja käitumusega seotud neurotoksilisust ning iseloomustavad ja kvantifitseerivad neurotoksilisi reaktsioone.

▼B

Varem võrdsustati neurotoksilisust neuropaatiaga, millega kaasnevad neuropatoloogilised kahjustused või neuroloogilised väärtalitlused nagu atakk, halvatus või värin. Kuigi neuropaatia on neurotoksilisuse tähtis ilming, on nüüd selge, et on palju muid närvisüsteemi mürgistusnähte (nt motoorse koordineerimise kadumine, sensoorsed puudujäägid, õppimis- ja mäluhäired), mida ei pruugita kajastada neuropaatias või muud liiki uuringutes.

Käesolev neurotoksilisust uuriv katsemeetod on välja töötatud närvi-käitumis- ja neuropatoloogiliste häirete tuvastamiseks täiskasvanud närilistel. Kuigi käitumishäired, isegi juhul, kui morfoloogilised muutused puuduvad, võivad peegeldada negatiivset mõju organismile, ei ole mitte kõik käitumismuutused närvisüsteemile omased. Seetõttu tuleks täheldatud muutusi hinnata koostoimes nii korrelatiivsete histopatoloogiliste, hematoloogiliste või biokeemiliste andmetega kui ka muud süsteemse toksilisuse liiki käsitlevate andmetega. Käesoleva meetodiga ettenähtud neurotoksiliste reaktsioonide iseloomustamiseks ja kvantifitseerimiseks tehtav uurimine hõlmab histopatoloogilisi ja käitumisega seotud menetlusi, mida võivad toetada elektrofüsioloogilised ja/või biokeemilised uuringud (1, 2, 3, 4).

Neurotoksilised ained võivad toimida närvisüsteemi mitmetele osadele ja paljude mehhanismide kaudu. Kuna ükski katsesari ei ole võimeline põhjalikult hindama kõikide ainete neurotoksilist võimet, võib osutada vajalikuks kasutada muid *in vivo* või *in vitro* katseid, mis on omased täheldatud või ootuspärase neurotoksilisuse liigile.

Käesolevat katsemeetodit võib samuti kasutada koostoimes OECD neurotoksilisuse uurimise strateegiat ja meetodeid käsitlevas juhisdokumentis (1) sätestatud juhistega, et töötada välja uuringud, mis on ette nähtud täiendavaks kirjeldamiseks või annus-reaktsiooni kvantifikatsiooni tundlikkuse suurendamiseks, et paremini hinnata täheldamata negatiivse mõju määra või kinnitaksid kemikaali teadaolevaid või kahtlustatavaid ohte. Näiteks võib välja töötada uuringud, millega neurotoksilisi mehhanisme identifitseeritakse ja hinnatakse või täiendatakse andmeid, mis on saadud juba põhiliste närvi-käitumis- ja neuropatoloogiliste vaatlusprotseduuride kasutamisel. Sellistes uuringutes ei ole vaja hankida andmeid, mis on saadud juba käesoleva meetodi poolt soovitatud standardmenetluste kasutamisel, kui sellised andmed on juba olemas ja neid ei peeta vajalikuks uuringu tulemuste tõlgendamisel.

Käesolev neurotoksilisuse uuring, kas eraldi või millegagi koos kasutades, annab sellist teavet, mida saab:

- kindlaks teha, kas närvisüsteem on alaliselt või pöörduvalt uuritud kemikaali tõttu kahjustatud;
- aidata kaasa selliste närvisüsteemi muutuste iseloomustamisele, mis on seotud kemikaalidega kokkupuutega ja aluseks oleva mehhanismi mõistmisele;

▼B

— kindlaks määrata annuse ja selle reaktsiooni ning aja ja reaktsiooni suhted, et hinnata täheldamata negatiivse mõju määra (mida saab kasutada kemikaalide ohutuskriteeriumide loomisel).

Käesolevas katsemeetodis manustatakse katseainet suu kaudu. Võib kasutada ka muid manustamismeid (nt naha kaudu või sisse hingates), kuid see võib eeldada soovitatud protseduuride muutmist. Manustamistee valiku kaalutlused sõltuvad inimeste kokkupuute profiilist ja olemasolevast toksikoloogilisest või kineetilisest teabest.

1.2. MÕISTED

Kahjulik mõju – selline töötlemisega seotud muutus algtasemest, mis vähendab organismi võimet ellu jääda, sigida või kohaneda keskkonnaga.

Annus – manustatava katseaine kogus. Annust väljendatakse massina (g, mg) või katseaine massina katselooma massiühiku kohta (nt mg kg kohta) või konstantsete toidukontsentratsioonidega (ppm).

Annustamine – üldmõiste, mis hõlmab annust, annustamise sagedust ja kestust.

Neurotoksilisus – negatiivne muutus närvisüsteemi struktuuris ja funktsioonis, mis tuleneb kemikaali, bioloogilise või füüsilise mõju-ritega kokkupuutest.

Neurotoksiline aine – kemikaal, bioloogiline või füüsiline mõjur, mis võib põhjustada neurotoksilisust.

NOAEL – lühend täheldamata-kahjuliku-mõju määra kohta ja see on kõrgeim annusmäär, kus ei ole täheldatud kahjulikke, katse tegemisega seotud leide.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Katsekemikaali manustatakse suu kaudu erinevat annustena laborinäriliste mitmele rühmale. Korduvad annused on tavaliselt eeldatud, ning annustamisrežiim võib olla 28 päeva, subkrooniline 90 päeva või krooniline üks aasta või kauemgi. Käesolevas katsemeetodis sätestatud menetlusi võib samuti kasutada ägeda neurotoksilise uuringuks. Loomi uuritakse, et tuvastata või iseloomustada käitumise ja/või neuroloogilisi kõrvalekaldeid. Igal vaatlusperioodil hinnatakse neurotoksiliste ainete mõjutatud hulka kattumisi. Katse lõpus osale loomadest (igas katserühmast, mõlemast soost) tehakse *in situ* perfusioon ning ajust, seljaajast ja perifeersetest närvidest prepareeritakse lõiked ja neid uuritakse.

Kui uuring tehakse eraldi uuringuga neurotoksilise skriinimiseks või neurotoksiliste mõjude iseloomustamiseks, võib kasutada igast rühmast loomi, keda ei kasutatud perfusioonil ja hiljem histopatoloogilisel uuringul (vt tabel 1), teatavate närvi-käitumis-, neuropatoloogilistel, neurokeemilistel või elektrofüsioloogilistel protseduuridel käesoleva meetodi (1) poolt nõutavatest standarduuringutest saadud andmete täiendamiseks. Need täiendavad protseduurid võivad olla eriti kasulikud, kui empiirilised vaatlused või oodatavad mõjud viitavad kemikaali neurotoksilise teatavale liigile või sihtmärgile. Alternatiivselt võib kasutada allesjäänud loomi sellistel hindamistel, mis on ette nähtud närilistega tehtavate korduva annusega toksilisuse uuringute katsemeetodites.

▼B

Kui käesoleva katsemeetodi protseduure kombineeritakse muude katsemeetodite protseduuridega, on vaja piisavalt loomi mõlemate uuringute vaatluste nõuete rahuldamiseks.

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS**1.4.1. Loomaliikide valik**

Eelistatud näriliste liik on rotid, kuigi võib põhjenduse korral kasutada ka näriliste teisi liike. Rakendatakse noorte täiskasvanute ja tervete loomade enimkasutatavaid laboritüvesid. Emasloomad ei tohi olla poeginud ega tiined. Annustamist tuleks alustada tavaliselt nii kiiresti kui võimalik pärast võõrutamist, soovitatavalt mitte enne, kui loomad on kuuenädalased, ja igal juhul enne, kui loomad on üheksanädalased. Kui käesolevat uuringut siiski kombineeritakse muude uuringutega, on vaja kohandada vanusenõuet. Uuringut alustades peaks loomade massi muutus olema minimaalne ja ei tohiks ületada ± 20 % iga soo keskmisest massist. Kui tehakse korduva annusega lühiajaline uuring pikaajalise uuringu alguuringuna, tuleks kasutada mõlemas uuringus samast liinist ja sama päritolu loomi.

1.4.2. Loomade pidamise ja toitmise tingimused

Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt ei ületa 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal, siis eesmärgiks on seda hoida vahemikus 50–60 %. Valgustus peaks olema kunstlik, järjestus on selline – 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Valju katkendlikku heli tuleks vältida. Toitmisel võib kasutada tavapärasest labori toiduvalikut koos piiramatu hulga joogiveega. Toiduvalikut võib mõjutada vajadus tagada katseaine sobiv lisamine, kui katseainet manustatakse käesoleva meetodi abil. Loomi võib hoida eraldi või väikestes samast soost loomade rühmades.

1.4.3. Loomade ettevalmistamine

Terved noored loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja katserrühma. Puurid asetatakse nii, et puuri asetamisest tingitud mõjud on võimalikult väikesed. Loomad identifitseeritakse individuaalselt ja hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne uuringu alustamist, et võimaldada laboritingimustega kohanemist.

1.4.4. Manustamisviisi ja annuste ettevalmistamine

Käesolevas katsemeetodis manustatakse katseainet suu kaudu. Suu kaudu saab manustada sondi abil, toiduga, joogiveega või kapslitena. Võib kasutada ka muid manustamisviise (nt naha kaudu või sisse hingates), kuid see võib eeldada soovitatud protseduuride muutmist. Manustamisviisi valiku kaalutlused sõltuvad inimeste kokkupuute omadustest ja olemasolevast toksikoloogilisest või kineetilisest teabest. Tuleks ära märkida põhjendus manustamisviisi valimiseks ning käesoleva meetodi protseduuride muudatuste tegemiseks.

▼B

Vajadusel lahustatakse või suspendeeritakse katseaine sobivas kandeaines. On soovitatav, et võimaluse korral kaalutakse esmalt vesilahuse/-suspensiooni kasutamist, seejärel õilahuse/-emulsiooni (nt maisiõli) kasutamist ja siis võimalikku muude kandealuste lahust/suspensiooni. Kandeaine toksilised omadused peaksid olema teada. Lisaks sellele tuleks arvesse võtta järgmisi kandeaine omadusi: katseaine absorptsiooni, jaotamist, metabolismi või peetumist käsitlevad mõjud; katseaine keemilisi omadusi käsitlevad mõjud, mis võivad muuta toksilisi omadusi; ning loomade toidu- või veetarbimist või toitumust käsitlevad mõjud.

1.5. PROTSEDUURID

1.5.1. Loomade arv ja sugu

Kui uuring tehakse eraldi uuringuga, tuleks kasutada vähemalt 20 looma (10 emaslooma ja 10 isaslooma) igas annus- ja kontrollrühmas üksikasjalike kliiniliste ja funktsionaalsete vaatluste hindamiseks. Vähemalt viiele isasloomale ja viiele emasloomale, kes on valitud nimetatud 10 isaslooma ja 10 emaslooma hulgast, teha perfusioon in situ ja kasutada neid üksikasjalikus neurohistopatoloogilises uuringus katse lõpus. Juhul, kui vaadeldakse üksnes piiratud arvu antud annusrühmas olevaid loomi neurotoksiliste mõjude tunnuste osas, tuleks arvesse võtta nimetatud loomade lisamist nende hulka, kes valitakse perfusiooniks. Kui uuring tehakse koos korduva annusega toksilisuse uuringuga, tuleks kasutada piisavalt loomi mõlema uuringu eesmärkide täitmiseks. Loomade minimaalne arv iga rühma kohta erinevate uuringute kombinatsioonides on toodud tabelis 1. Kui osa loomades surmataks uuringu kestel või suunatakse toibuvatest loomadest koosnevasse rühma toksiliste mõjude pöörduvuse, püsivuse või hilisema esinemise vaatlemiseks katse järel või kui kaalutakse täiendavaid vaatlusi, siis tuleks suurendada loomade arvu, tagamaks, et vaatluseks ja histopatoloogilisteks uurinuteks oleks kättesaadav nõutav arv loomi.

1.5.2. Katse- ja kontrollrühm

Tuleks kasutada vähemalt kolme katse- ja kontrollrühma, kuid kui muude andmete hindamisel ei eeldata ühtegi mõju korduva annusega 1 000 mg/kg kehamassi kohta päevas, võib teha piirkatse. Kui puuduvad sobivad andmed, tuleks teha annuse piirkonna määramise katse, et aidata kindlaks määrata kasutatavaid annuseid. Kontrollrühma loomi käsitletakse sarnaselt katserühma loomadega, kuid neile ei anta uuritavat ainet. Kui kandeainet kasutatakse katseaine manustamisel, peaks kontrollrühm saama kandeainet suurima kasutatud kogusena.

1.5.3. Usaldusväarsuse kontroll

Uuringut teostav labor peaks esitama andmed oma võime kohta teostada uuringut ja kasutatud protseduuride tundlikkuse kohta. Sellised andmed peaksid tõendama võimet tuvastada ja kvantifitseerida muutusi lõpp-punktides, mille vaatlemist soovitatakse. Nendeks on autonoomsed sümptomid, sensoorne reaktiivsus, jäsme haarded, jõud ja motoorne aktiivsus. Teave kemikaalide kohta, mis põhjustavad erinevat liiki neurotoksilisi reaktsioone ja mida võib kasutada positiivsete kontrollainetena, võib leida viidetes 2–9. Varasemaid andmeid võib kasutada, kui katsemenetluste olulised aspektid jäävad samaks. Varasemate andmete perioodiline ajakohastamine on soovitatav. Protseduuride jätkuvat tundlikkust tõendavad uued andmed tuleks luua, kui katset sooritav labor on muutnud katse tegemise mõningaid olulisi osasid või menetlusi.

▼B**1.5.4. Annuse valik**

Annusemäärade valimisel tuleks võtta arvesse kõiki katseühendi või sellega seotud ainete saadaolevaid varem saadud toksilisuse ja kineetilisi andmeid. Kõrgeim annusemäär tuleks valida eesmärgiga põhjustada neurotoksilisi mõjusid või selgeid süsteemseid toksilisi mõjusid. Tuleks valida annusmäärade alanev järjestus, eesmärgiga näidata annusega seotud reaktsiooni ja mittetähteldatud kahjulikku mõju (NOAEL) väikseima annusemäära puhul. Põhimõtteliselt tuleks annusemäärad kehtestada nii, et saaks eristada algseid toksilisi mõjusid närvisüsteemile süsteemse toksilisusega seotud mõjudest. Kahe- või kolmekordsed vahemikud on sageli optimaalsed ning sageli on eelistatud neljanda katserühma lisamine väga suurte vahemike (nt üle kümnekordne tegur) annuste vahel. Kui inimese vastuvõtlikkuse kohta on olemas mõistlik hinnang, tuleks seda arvesse võtta.

1.5.5. Piirkatse

Kui katse ühe annusega, milleks on vähemalt 1 000 mg/kg kehamassi kohta, kasutades kirjeldatud protseduure, ei põhjusta täheldatavaid neurotoksilisi mõjusid ja kui toksilisus ootuspäraselt põhineb struktuurselt lähedaste ainete andmetel, siis ei peeta kolme annuse taset käsitlevat täielikku uuringut vajalikuks. Inimeste ootuspärane kokkupuude võib viidata piirkatses kasutatavatest suukaudsetest annustest suuremate annuste kasutamise vajadusele. Muude manustamisviiside korral, nagu näiteks sissehingamine või naha kaudu manustamine, võivad katseaine füüsikalised-keemilised omadused tihti viidata suurimale kokkupuutetasemele. Ägeda suukaudse uuringu tegemiseks peaks piirkatse annus olema vähemalt 2 000 mg/kg.

1.5.6. Annuste manustamine

Loomadele annustatakse katseainet kord päevas, seitse päeva nädalas, vähemalt 28 päeva; viiepäevase annustamisrežiimi või lühema kokkupuute perioodi kasutamist on vaja põhjendada. Katseainet manustatakse ühekordse annusena sondi abil söögitoru kaudu või sobiva intubeerimise kanüüli abil. Vedeliku suurim kogus, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusel. Kogus ei tohiks ületada 1 ml/100 g kehamassi kohta. Vesilahuste puhul võib siiski manustada 2 ml/100 g kehamassi kohta. Arvesse võtmata ärritavaid või söövitavaid aineid, mille mõjud tavaliselt halvenevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katsekoguse varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide annuste korral jääks samaks.

Toidu või joogivee kaudu manustatud ainete puhul on oluline tagada, et hõlmatud katseaine kogused ei häiriks tavapärasest toitumist või veetasakaalu. Kui katseainet manustatakse toiduga kas püsiva toidukontsentratsioonina (ppm) või võidakse kasutada püsivat annusemäära looma kehamassi suhtes, siis tuleb täpsustada kasutatud alternatiivi. Sond kaudu manustatud aine puhul tuleks annus anda samal kellaajal iga päev ja kohandada vähemalt igal nädalal, et säilitada konstantne annusemäär looma kehamassi suhtes. Kui korduva annusega uuringut tehakse pikaajalise uuringu alguuringuga, tuleks kasutada mõlemas uuringus sama toitu. Erandkorras, kui ühekordne annus ei ole võimalik, manustatakse annust väiksemates osades kuni 24 tunni jooksul.

▼B

1.6. VAATLUSED

1.6.1. **Vaatluste ja katsete sagedus**

Korduva annusega uuringutes peaks vaatlusperiood hõlmama annustamisperioodi. Akuutsetes uuringutes tehakse vaatlusi katse järel 14 päeva. Satelliitrühma kuuluvate loomade puhul, keda hoitakse kokkupuutumise eest katsejärgsel perioodil, peaks vaatlused hõlmama sama perioodi.

Vaatlusi tuleks teha piisavalt sageli, et suurendada mis tahes käitumisega seotud ja/või neuroloogiliste kõrvalekallete tuvastamise tõenäosust. Vaatlusi peaks tegema soovitatavalt sama ajal iga päev, võttes arvesse oodatavate mõjude kõrghetke pärast annustamist. Kliiniliste vaatluste ja funktsionaalsete katsete sagedus on esitatud kokkuvõtlikult tabelis 2. Kui varasematest uuringutest saadud kineetilised või muud andmed viitavad vajadusele kasutada erinevaid vaatlus-, katse- või vaatlusjärgseid aja hetki, tuleks vastu võtta alternatiivne ajakava maksimaalse teabe saamiseks. Ajakava muudatuste kohta tuleks esitada põhjendus.

1.6.1.1. *Üldise tervisliku seisundi ja suremuse/haigestumuse vaatlused*

Kõiki loomi tuleks hoolikalt vaadelda vähemal kord päevas nende tervisliku seisundit arvesse võttes ning vähemalt kaks korda päevas haigestumuse ja suremuse osas.

1.6.1.2. *Üksikasjalikud kliinilised vaatlused*

Üksikasjalikud kliinilised vaatlused tuleks teha kõikide loomade kohta, kes on valitud sel eesmärgil (vt tabel 1), üks kord enne esimest kokkupuudet (et võimaldada sama katselooma käsitlevaid võrdlusi) ja seejärel erinevate ajavahemike tagant, sõltuvalt uuringu kestusest (vt tabel 2). Üksikasjalikud kliinilised vaatlused toibuvate loomade satelliitrühmade kohta tuleks teha toibumisperioodi lõpus. Üksikasjalikud kliinilised vaatlused tuleks teha looma oma puurist väljaspool standardalal. Neid peaks hoolikalt registreerima, kasutades punktisüsteeme, mis hõlmavad kriteeriume või punktiskaalasid iga vaatluse käigus tehtava mõõtmise kohta. Kasutatavad kriteeriumid või skaalad tuleks selgesõnaliselt määratleda katselabori poolt. Tuleb püüda tagada, et muutused katsetingimustes oleksid minimaalsed (mitte süsteemselt seotud katsega) ning et vaatlusi teeks koolitatud vaatlejad, kes ei ole teadlikud tegelikust käsitlemisest.

On soovitav, et vaatlusi tehtaks struktuurselt, et täpselt määratletud kriteeriume (kaasa arvatud määratlus „normaalne vahemik”) kohaldatakse süsteemselt iga looma suhtes igal vaatlusel. Normaalne vahemik tuleks adekvaatselt dokumenteerida. Kõik täheldatud sümptomid tuleks registreerida. Kui see on teostatav, tuleks registreerida ka täheldatud sümptomite suurus. Kliinilised vaatlused peaksid hõlmama, kuid mitte ainult, naha, karvkatte, silmade, limaskestade, eritiste esinemise ja autonoomse aktiivsuse (nt pisaravool, piloereksioon, pupilli suurus, ebatavaline hingamismudel ja/või suu kaudu hingamine (lõõtsutamine), kõik urineerimise või roojamisega seotud ebatavalised sümptomid ning uriini värvumine) muutusi.

▼B

Kõik ebatavalised reaktsioonid seoses kehaasendi, aktiivsuse astme (nt standardala vähenenud või suurenenud uurimine) ning liigutuste koordineerimisega tuleks samuti üles märkida. Muutused kõnnakus (nt taarumine, ataksia), kehaasendis (nt kүүrus selg) ning käsitlemise, asetamise või muude keskkonnaga stiimulitega seotud reaktiivsuses ning klooniiliste või tooniiliste liigutuste, krampide või värinate esinemine, stereotüübid (nt ülemäärane sugemine, ebatavalised pea liigutused, korduv tiirutamine) või veider käitumine (nt hammustamine või ülemäärane lakkumine, enesesandistamine, tagurpidi kõndimine, häälitsemine) või agressiivsus tuleks registreerida.

1.6.1.3. *Funktsionaalsed katsed*

Sarnaselt üksikasjalikele kliinilistele vaatlustele, tuleks funktsionaalsed katsed samuti teostada üks kord enne kokkupuudet ja seejärel sageli kõiki loomadega, kes on sel eesmärgil välja valitud (vt tabel 1). Funktsionaalsete katsete tegemise sagedus on samuti sõltuv uuringu kestuses (vt tabel 2). Lisaks tabelis 2 sätestatud vaatlusperioodidele tuleks funktsionaalsed vaatlused toibuvate loomade satelliitühmade suhtes samuti teha võimalikult lähedal lõplikule surmamisele. Funktsionaalsetes katsetes peaks käsitlema sensoorset reaktiivsust erinevatele stiimulitele (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptorsed stiimulid (5, 6, 7)), jäseme haardejõu hindamine (8) ja motoorse tegevuse hindamine (9). Motoorset tegevust tuleks mõõta automaatseadme abil, mis on võimeline avastama nii tegevuse vähenemise kui suurenemise. Kui kasutatakse muud kindlaksmääratud süsteemi, peaks see olema kvantitatiivne ning selle tundlikkus ja usaldusväärsus peaksid olema tõendatud. Iga seadet tuleb testida selle usaldusväärsuse tagamiseks aja jooksul ja seadmete vastavuse tagamiseks. Järgitavate protseduuride täiendavad üksikasjad on toodud vastavates viidetes. Kui puuduvad andmed (nt struktuuraktiivsus, epidemioloogilised andmed, muud toksikoloogilised uuringud), mis viitaksid võimalikele neurotoksiliste mõjudele, tuleks kaaluda sensoorseid ja motoorseid funktsioone või õppimist ja mälu uurivate täpsemate katsete lisamist nimetatud võimalike mõjude uurimiseks üksikasjalikumalt. Viites 1 on esitatud rohkem teavet täpsemate katsete ja nende kasutamise kohta.

Erandkorras, loomad, kel ilmnevad mürgistusnähud sellises ulatuses, et see oluliselt häiriks funktsionaalse katse sooritamist, võib katsest välja jätta. Tuleks esitada loomade funktsionaalsest katsest väljajätmise põhjendus.

1.6.2. **Kehamass ja toidu/vee tarbimine**

Kuni 90päevaste uuringute puhul tuleks loomi kaaluda vähemalt kord nädalas ja mõõtmisi tuleks teha toidu tarbimise kohta (vee tarbimine, kui katseainet manustatakse nimetatud keskkonnas) vähemalt kord nädalas. Pikaajaliste uuringute puhul tuleks kaaluda kõiki loomi vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala jooksul ja seejärel vähemalt kord iga 4 nädala tagant. Mõõtmisi toidu tarbimise kohta (vee tarbimine, kui katseainet manustatakse nimetatud keskkonnas) tuleks teha vähemalt kord nädalas esimese 13 nädala jooksul ja seejärel ligikaudu kolmekuuliste intervallide tagant, välja arvatud juhul, kui tervislik seisundi või kehamassi muutumine näeb ette teisiti.

▼B**1.6.3. Oftalmoloogia**

Pikemate kui 28päevaste uuringute puhul tuleks teha oftalmoloogiline uuring, kasutades oftalmoskoopi või samalaadset sobivat instrumenti, enne katseaine manustamist ja katse lõpetamisel, eelistatavalt kõikide loomadega, kuid vähemalt loomadega, kes on suure annusemääraga või kontrollrühmades. Kui avastatakse muutused silmades või kui kliinilised tunnused viitavad selle vajadusele, tuleks uurida kõiki loomi. Pikaajaliste uuringute puhul tuleks teha oftalmoloogiline uuring 13 nädala jooksul. Oftalmoloogilisi uuringuid ei ole vaja teha, kui selle kohta on juba olemas andmed, mis on saadud muudest, sarnase kestusega ja samalaadse annusemääraga uuringutest.

1.6.4. Hematoloogia ja kliiniline biokeemia

Kui neurotoksilisuse uuring tehakse koos korduva annusega süsteemse toksilisuse uuringuga, tuleks teha hematoloogilised uuringud ja kliinilise biokeemia määramised vastavalt süsteemse toksilisuse uuringu asjaomasele meetodile. Proove tuleks koguda selliselt, et vähendatakse kõiki võimalikke mõjusid neuroloogilisele käitumisele.

1.6.5. Histopatoloogia

Neuropatoloogiline uuring tuleks välja töötada uuringu *in vivo* etapis tehtud vaatluste täiendamiseks ja laiendamiseks. Proovid vähemalt viie looma kudedest soo ja rühma kohta (vt tabel 1 ja järgmine lõige) fikseeritakse *in situ*, kasutades üldtunnustatud perfusiooni- ja fiksaatsioonitehnikat (vt 3. viite 5. peatükk ja 4. viite 50. peatükk). Kõik täheldatavad suured muutused tuleks registreerida. Kui uuringut teostatakse eraldi uuringuga neurotoksilisuse skriinimiseks või neurotoksiliste mõjude iseloomustamiseks, võib kasutada ülejäänud loomi kas teatavate neuroloogilise käitumisega seotud (10, 11), neuropatoloogilistes (10, 11, 12, 13), neurokeemilistes (10, 11, 14, 15) või elektrofüsioloogilistes (10, 11, 16 17) protseduurides, mis võivad täiendada siin kirjeldatud protseduure ja uuringuid, või kasutada histopatoloogias uuritavate subjektide arvu suurendamiseks. Need täiendavad protseduurid võivad olla eriti kasulikud, kui empiirilised vaatlused või oodatavad mõjud viitavad kemikaali neurotoksilisuse (2, 3) teatavale liigile või sihtmärgile. Alternatiivselt võib ülejäänud loomi samuti kasutada rutiinsetes patoloogilistes hindamistes, nagu on kirjeldatud korduvate annustega uuringute meetodis.

Kõik parafiini valatud koeproovid värvitakse üldise värvimisprotseduuri abil, nt hematoksüliin ja eosin (H&E), ning neid uuritakse mikroskoopiliselt. Kui täheldatakse või kahtlustatakse perifeerse neuropaatia sümptomeid, tuleks uurida plastikusse valatud perifeerse närvikoe proove. Kliinilised tunnused võivad anda põhjust uute kohtade uurimisele või eriliste värvimismenetluste kasutamisele. Viidetes (3) ja (4) on antud juhised täiendavate uuringukohtade kohta. Samuti võivad sobivad erivärvid olla abiks teatud liiki patoloogilistele muutustele viitamisel (18).

▼B

Kesk- ja perifeerse närvisüsteemi representatiivsed löike tuleks uurida histoloogiliselt (vt 3. viite 5. peatükk ja 4. viite 50. peatükk). Uuritavad alad peaksid tavaliselt sisaldama järgmist: eesaju, suuraju keskosa, sh hipokampi läbiv löige, keskaju, väikeaju, ajusild, piklikaju, silm koos nägemisnärviga ja võrkkestaga, seljaaju kaela- ja nimmetüve kohal, spinaalganglion, spinaal- ja ventraalnärvikiud, proksimaalne istmikunärv, proksimaalne säärenärv (põlves) ja säärenärvipoolsed sääremarjalihase harud. Seljaajust ja perifeersest närvist tehtavate lõigete hulka kuuluvad nii rist- kui pikilõiked. Tähelepanu tuleks pöörata närvisüsteemi veresoonestrukturele. Samuti tuleks uurida skeletilihastest, eelkõige sääremarjalihastest võetud proovi. Erilist tähelepanu tuleks pöörata kesk- ja perifeerse närvisüsteemi kohtadele, mille raku- ja kiustruktuur ja -tüüp on teatavasti eriti mõjutatud neurotoksiliste ainete poolt.

Viidetes 3 ja 4 on toodud selliseid neuropatoloogilisi muutusi käsitlev juhend, mida põhjustab kokkupuude toksiliste ainetega. Etapiviisiline koeproovide uuring on soovitatav, milles võrreldakse esmalt suure annusega rühma löikeid kontrollrühma lõigetega. Kui ei ole täheldatud neuropatoloogilisi muutusi nimetatud rühmade proovides, ei ole vaja teha hilisemaid analüüse. Kui neuropatoloogilisi muutusi on täheldatud suure annusega rühmas, tuleks seejärel keskmiste ja väikese annusega rühma igast võimalikust mõjutatud koest võetud proovid kodeerida ja hiljem neid uurida.

Kui leitakse tõendeid neuropatoloogiliste muutuste kohta kvalitatiivses uuringus, siis tuleks teha teine uuring kõikides närvisüsteemi piirkondades, kus nimetatud muutused esinevad. Kõikide annuserühmade igast võimalikust mõjutatud piirkonnast võetud lõiked tuleks kodeerida ja neid tuleks uurida juhuslikult ilma koodi teadmata. Iga kahjustuse sagedus ja raskusaste tuleks registreerida. Pärast seda, kui kõikide annuserühmade kõiki piirkondi on hinnatud, saab koodi murda ja teha statistilise analüüsi annuse ja sellele reageerimise suhte hindamiseks. Erineva raskusastmega kahjustuse näiteid tuleks kirjeldada.

Neuropatoloogilisi leide tuleks hinnata käitumisega seotud vaatluste ja mõõtmiste kontekstis ning katseaine varasematest ja praegustest süsteemse toksilisuse uuringutest saadud muude andmete põhjal.

2. TULEMUSED

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Tulemused esitatakse iga üksiku looma kohta. Lisaks sellele tuleks esitada kõik andmed kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates iga katse- või kontrollrühma puhul ära loomade arvu katse alguses, katse käigus surnud või humaanselt surmatud loomade arvu ning kõikide surmade või humaansete tapmisteaaja, mürgistusnähtude arvu, täheldatud mürgistusnähtude kirjelduse, sh toksiliste mõjude algusaja, kestuse, liigi ja raskuse, kahjustustega loomade arvu, sh kahjustus(t)e liik ja raskus.

▼B

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Uuringu avastusi peaks hindama neuroloogiliste käitumisega seotud ja neuropatoloogiliste mõjude (neurokeemilised või elektrofüsioloogilised mõjud ning kui lisatakse täiendavad uuringud) esinemissageduse, raskuse ja korrelatsiooni osas ning kõikide muude negatiivsete mõjude osas. Võimaluse korral tuleks hinnata numbrilisi tulemuse sobiva ja üldiselt heakskiidetud statistilise meetodi abil Statistilised meetodid tuleks valida uuringu väljatöötamise ajal.

3. ARUANDLUS

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Katseaine:

- füüsiline laad (sh isomeersus, puhtus ja füüsikalise-keemilised omadused);
- tunnusandmed.

Kandeaine (vajaduse korral):

- kandeaine valiku põhjendamine.

Katseloomad:

- kasutatud liigid/liinid;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, kohanemine, toitumine jne;
- iga looma kaal katse alguses.

Katsetingimused:

- katseaine valmistise/toiduvalmistise üksikandmed, saavutatud kontsentratsioon, valmistise stabiilsus ja homogeensus;
- manustatavate annuste täpsustamine, sh kandeaine, mahu ja manustatava aine füüsilise vormi üksikasjad;
- katseaine manustamise üksikasjad;
- annusemäärade valiku põhjendus;
- põhjendus kokkupuute viise ja kestuse kohta;
- toidu/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) muutmine tegelikuks annuseks (mg/kg kehamassi kohta päevas), vajaduse korral;
- üksikasjad toidu ja vee kvaliteedi kohta.

Vaatlus ja katsemenetlused:

- üksikasjad igast rühmast loomade määramise kohta perfusiooni alamrühmadesse;
- punktisüsteeme käsitlevad üksikasjad, sh üksikasjalike kliiniliste vaatluste iga mõõtmise kriteeriumid ja punktiskaalad;

▼B

- üksikasjad funktsionaalsete katsete kohta, milles uuritakse sensoorset reaktiivsust erinevatele stiimulitele (nt kuulmis-, nägemis- ja propriotseptorsed stiimulid); hinnatakse jäseme haardejõudu; hinnatakse motoorset tegevust (sh üksikasjad automaatseadmete kohta, mis avastavad tegevust); ja, muude käsutatavate menetluste kohta;
- üksikasjad oftalmoloogiliste uuringute kohta ja vajadusel hematoloogiliste uuringute ning kliinilise biokeemia katsete kohta ning asjaomase lähtetaseme väärtuste kohta;
- üksikasjad teatavate neuroloogiliste käitumisega seotud, neuropatoloogiliste, neurokeemiliste või elektrofüsioloogiliste menetluste kohta.

Tulemused:

- kehamass/kehamassi muutused, sh kehamass surmamise hetkel;
- toidu ja vee tarbimine vajadusel;
- toksilist reaktsiooni käsitlevad andmed ja annusemäär, sh toksilisuse või suremuse sümptomid;
- üksikasjalike kliiniliste vaatluste (pöörduvad või pöördumatud) olemuse, raskuse ja kestuse kohta (algusaeg ja edasine käik);
- funktsionaalsete katsete tulemuste üksikasjalik kirjeldus;
- lahangu leiud;
- vajadusel kõikide neuroloogiliste käitumisega seotud, neuropatoloogiliste ja neurokeemiliste või elektrofüsioloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- andmed absorptsiooni ja metabolismi kohta (kui seda on mõõdetud)
- vajadusel tulemuste statistiline töötlemine.

Tulemuste arutelu:

- teave annuse ja sellele reageerimise kohta;
- muude toksiliste mõjude seos uuritud kemikaali võimaliku neurotoksilisuse kohta tehtud järeldusega;
- täheldamata negatiivse mõju tase.

Järeldused:

- uuritava kemikaali üldist neurotoksilisust käsitlevat erimärget soositakse.

4.

VIITED

- 1) OECD Guidance 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, PS. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, PS. 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 Hindlimb 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). Neuropathology 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 Practice of Histological Techniques*. Chapter 17, *Neuropathological Techniques*. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.



Tabel 1

Minimaalne loomade arv rühmas, kui neurotoksilisuse uuringut tehakse eraldi või koos muude uuringutega

	NEUROTOKSILISUSE UURING, MIS ON TEHTUD:			
	eraldi uuringuna	kombineeritud 28päevase uuringuga	kombineeritud 90päevase uuringuga	kombineeritud kroonilise toksilisuse uuringuga
<i>Loomade koguarv rühma kohta</i>	10 isaslooma ja 10 emaslooma	10 isaslooma ja 10 emaslooma	15 isaslooma ja 15 emaslooma	25 isaslooma ja 25 emaslooma
Funktsionaalsete katsete, sh üksikasjalike kliiniliste vaatluste jaoks välja valitud loomade arv	10 isaslooma ja 10 emaslooma	10 isaslooma ja 10 emaslooma	10 isaslooma ja 10 emaslooma	10 isaslooma ja 10 emaslooma
Perfusiooniks <i>in situ</i> ja neurohistopatoloogiaks valitud loomade arv	5 isaslooma ja 5 emaslooma	5 isaslooma ja 5 emaslooma	5 isaslooma ja 5 emaslooma	5 isaslooma ja 5 emaslooma
Loomade arv, kes on välja valitud korduva annusega/-subkroonilise/kroonilise mürgisuse vaatlustes, hematoloogias, kliinilises biokeemias, histopatoloogias jne, nagu on märgitud vastavates juhendites		5 isaslooma ja 5 emaslooma	10 isaslooma † ja 10 emaslooma †	20 isaslooma † ja 20 emaslooma †
Vajadusel täiendavad vaatlused	5 isaslooma ja 5 emaslooma			

† Siia rühma kuulub viis looma, kes on valitud funktsionaalseks katseks ja üksikasjalikeks kliinilisteks vaatlusteks neurotoksilisuse uuringu osana.



Tabel 2

Kliiniliste vaatluste ja funktsionaalsete katsete sagedus

Vaatluste liik		Uuringu kestus			
		Äge	28päevane	90päevane	Krooniline
Kõikidel loomadel	üldine tervislik seisund	kord päevas	kord päevas	kord päevas	kord päevas
	suremus/haigestumus	kaks korda päevas	kaks korda päevas	kaks korda päevas	kaks korda päevas
<i>Funktsionaalseteks vaatlusteks valitud loomadel</i>	<i>üksikasjalikud kliinilised vaatlused</i>	<ul style="list-style-type: none"> — enne esimest kokkupuudet — 8 tunni jooksul pärast annustamist ajal, mil mõju on hinnanguliselt suurim — 7. ja 14. päeval pärast annustamist 	<ul style="list-style-type: none"> — enne esimest kokkupuudet — seejärel kord nädalas 	<ul style="list-style-type: none"> — enne esimest kokkupuudet — kord esimese ja teise kokkupuute-nädala jooksul — seejärel kord kuus 	<ul style="list-style-type: none"> — enne esimest kokkupuudet — kord esimese kokkupuutekuu lõpus — seejärel iga kolme kuu tagant
	Funktsionaalsed katsed	<ul style="list-style-type: none"> — enne esimest kokkupuudet — 8 tunni jooksul pärast annustamist ajal, mil mõju on hinnanguliselt suurim — 7. ja 14. päeval pärast annustamist 	<ul style="list-style-type: none"> — enne esimest kokkupuudet — neljandal annustamis-nädalal võimalikult lähedal kokkupuute-perioodi lõpule 	<ul style="list-style-type: none"> — enne esimest kokkupuudet — kord esimese ja teise kokkupuute-nädala jooksul — seejärel kord kuus 	<ul style="list-style-type: none"> — enne esimest kokkupuudet — kord esimese kokkupuutekuu lõpus — seejärel iga kolme kuu tagant

▼B**B.44. NAHAKAUDNE IMENDUMINE: *IN VIVO* MEETOD****1. MEETOD**

Käesolev katsemeetod vastab suunisele OECD TG 427 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Paljude kemikaalidega puututakse kokku peamiselt naha kaudu, samas kui suurema osa toksikoloogiliste uuringute puhul manustatakse uuritavaid aineid katseloomadele suu kaudu. Käesolevas juhendis kirjeldatud *in vivo* nahakaudse imendumise uuring annab vajaliku seose, millega suukaudse manustamise uuringutest saab teha oletusi aine ohutuse kohta naha kaudu kokkupuutumisel.

Aine peab enne vereringesse jõudmist läbima suure hulga naharakude kihte. Enamiku ainete puhul määrab sissetungimise kiiruse sarvkiht (*stratum corneum*), mis koosneb surnud rakkudest. Naha läbilaskvus sõltub kemikaali lipofiilsusest ja epidermise välimise kihi paksusest ning ka sellistest teguritest nagu aine molekulmass ja kontsentratsioon. Üldiselt on rottide ja küülikute nahk kergemini läbitav kui inimnahk, samas kui merisigade ja ahvide naha läbitavus sarnaneb inimnaha omale.

Nahakaudse imendumise mõõtmise meetodeid saab jagada kahte kategooriasse: *in vivo* ja *in vitro*. *In vivo* meetod võib anda usaldusväärset teavet nahakaudse imendumise kohta eri liikide katseloomadel. Viimasel ajal on välja töötatud *in vitro* meetodeid. Nende puhul uuritakse aine tungimist läbi looma või inimese osalise või täispaksusega naha vedelikureservuaari. *In vitro* meetodit on kirjeldatud eraldi teise katsemeetodi all (1). Soovitav on tutvuda OECD juhenddokumendiga nahakaudse imendumise uuringute läbiviimiseks (2); dokument aitab valida kõige sobivama meetodi igas konkreetses olukorras, kuna selles on esitatud rohkem üksikasju nii *in vivo* kui ka *in vitro* meetodi sobivuse kohta.

Käesolevas metoodikas kirjeldatud *in vivo* meetod võimaldab määrata uuritava aine tungimist läbi naha süsteemsesse vereringesse. Kõnealust meetodit on laialdaselt kasutatud palju aastaid (3, 4, 5, 6 ja 7). Kuigi paljudel juhtudel võivad sobida nahakaudse imendumise *in vitro* uuringud, võib esineda ka olukordi, kus ainult *in vivo* uuringuga on võimalik saada vajalikke andmeid.

In vivo meetodi eelis on füsioloogia ja metabolismi seisukohast täieliku süsteemi kasutamine, ühe loomaliigi kasutamine paljude toksilisusuuringute läbiviimiseks ja võimalus meetodit modifitseerida teiste loomaliikidega kasutamiseks. Puudusteks on elusloomade kasutamine, vajadus kasutada usaldusväärsete tulemuste saamiseks radioaktiivselt märgistatud materjali, raskused varase imendumise faasi kindlaksmääramisel ning eelistatava loomaliigi (rott) ja inimese naha läbilaskvuse erinevused. Loomade nahk laseb üldiselt aineid paremini läbi ja seetõttu võidakse imendumist läbi inimnaha üle hinnata (6, 8 ja 9). Leeliselisi/söövitavaid aineid ei tohiks elusloomadel katsetada.

▼B

1.2. MÄÄRATLUSED

Imendumata kogus – kogus, mis pestakse maha naha pinnalt pärast kokkupuudet ja mis leidub difusiooniraku peal asuval kattel, sealhulgas kogus, mille kohta näidatakse, et see lendub nahalt kokkupuute ajal.

Imendunud kogus (*in vivo*) – kogus, mis leitakse uriinis, puuri pesemise vedelikus, roojas, väljahingatud õhus (kui seda mõõdetakse), veres, kudedes (kui neid kogutakse) ja ülejäänud korjuses pärast pealekandmiskoha naha eemaldamist.

Imenduv kogus – kogus, mis jääb nahale või naha sisse pärast pesemist.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritav aine, eelistatavalt radioaktiivselt märgistatud, kantakse looma paljaksügatud nahale ühes või enamas sobivas annuses tavaliselt kasutatava preparaadi kujul. Uuritav valmistis jäetakse ettenähtud ajaks nahaga kokkupuutesse sobiva katte all (mis võib kokkupuutekohta lihtsalt katta, pooltihedalt või tihedalt katta), et vältida uuritava valmistise allaneelamist. Kokkupuute lõppedes eemaldatakse kate ja nahk puhastatakse sobiva puhastusainega; kate ja puhastusmaterjal jäetakse analüüsimise jaoks alles ja pannakse uus kate. Loomi hoitakse enne kokkupuudet, selle ajal ja pärast seda metabolismi uurimise üksikpuurides ning nende perioodide väljaheidet ja väljahingatud õhk kogutakse analüüsimiseks. Väljahingatud õhu kogumise võib ära jätta, kui on piisavalt teavet selle kohta, et lenduvat radioaktiivset metaboliiti tekib vähe või üldse mitte. Iga uuringu jaoks võetakse tavaliselt mitu rühma loomi, kes viiakse kokkupuutesse uuritava valmistisega. Üks rühm surmatakse kokkupuuteperioodi lõpus. Teised rühmad surmatakse kindlaksmääratud ajavahemike järel pärast seda (2). Proovivõtutaja lõppedes surmatakse allesjäänud loomad, veri kogutakse analüüsimiseks, uuritava aine pealekandmise koht eemaldatakse analüüsimiseks ja korjust analüüsitakse eritumata materjali määramiseks. Proove analüüsitakse sobivate meetoditega ning hinnatakse nahakaudse imendumise taset (6, 8 ja 9).

1.4. MEETODI KIRJELDUS

1.4.1. Loomaliigi valimine

Kõige sagedamini kasutatav loomaliik on rott, kuid kasutada võib ka karvavabasiid liine ja liike, kellel nahakaudse imendumise kiirus sarnaneb enam inimese omale (viited 3, 6, 7, 8 ja 9). Kasutada tuleb noori terveid täiskasvanud loomi, kes on ühest soost (tavaliselt isased) ja kuuluvad tavaliselt kasutatavatesse laboriliinidesse. Uuringu alguses ei tohiks katselooma kehakaalu erinevus keskmisest kehakaalust ületada $\pm 20\%$. Näiteks on sobivad 200–250 g kaaluvad isasrotid, eriti selle vahemiku ülemisse poolde kuuluvad loomad.

▼B**1.4.2. Loomade arv ja sugu**

Iga uuritava valmistise ja iga planeeritud lõpetamisaja kohta tuleb kasutada vähemalt nelja ühest soost looma. Iga loomade grupp surmatakse erinevate ajavahemike möödudes, näiteks kokkupuuteperioodi (tavaliselt 6 või 24 tundi) lõppedes ja sellele järgnevate ajavahemike järel (nt 48 ja 72 tunni möödudes). Kui on andmeid, et nahakaudne toksilisus isas- ja emasloomade suhtes on oluliselt erinev, tuleb valida tundlikum sugu. Kui selliseid andmeid ei ole, võib kasutada ükskõik kumba sugu.

1.4.3. Pidamis- ja söötmingimused

Temperatuur katseloomade ruumis peab olema 22 °C (± 3 °C). Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavalist laborisööta ja see peab olema vabalt kättesaadav koos piiramatult joogivee varuga. Uuringu ajal ja eelistatavalt ka aklimatiseerumise ajal on loomad metabolismi uurimise üksikpuurides. Kuna sööda ja vee sattumine puuri põrandale võib tulemusi rikkuda, tuleb püüda seda võimalust minimeerida.

1.4.4. Loomade ettevalmistamine

Loomad märgistatakse, et iga looma saaks identifitseerida, ja neid hoitakse enne uuringu algust puurides vähemalt viis päeva, et nad harjuksid laboritingimustega.

Pärast aklimatiseerumisperioodi ja umbes 24 tundi enne uuritava aine pealekandmist pügatakse igal loomal nahk õlgade ja selja piirkonnas paljaks. Kahjustatud naha läbilaskvus erineb terve naha omast, seepärast tuleb olla ettevaatlik ja vältida naha marrastamist. Pärast pügamist ja umbes 24 tundi enne uuritava aine kandmist nahale (vt punkti 1.4.7) puhastatakse naha pinda atsetooniga rasu eemaldamiseks. Lisapesu seebi ja veega ei soovitata, kuna seebijaagid võivad soodustada katseaine imendumist. Ala peab olema piisavalt suur, et võimaldada imendunud uuritava kemikaali koguse arvutamist naha cm^2 kohta, eelistatavalt vähemalt 10 cm^2 . Selline ala on saavutatav 200–250 g kaaluvatel rottidel. Pärast loomade ettevalmistamist pannakse nad tagasi metabolismi uurimise puuridesse.

1.4.5. Uuritav aine

Uuritav aine on aine, mille läbitungimisvõimet uuritakse. Väga hea oleks, kui uuritav aine oleks radioaktiivselt märgistatud.

1.4.6. Uuritav valmistis

Uuritava aine valmistis (st puhas aine, lahjendatud aine või segu, mis sisaldab nahale kantavat uuritavat kemikaali) peab olema sama, millega inimesed või võimalikud sihtloomaliigid võivad kokku puutuda (või aimama seda tõetruult järele). Kõiki kõrvalekaldeid tegelikult kasutatavast valmistisest tuleb põhjendada. Vajadusel lahustatakse või suspendeeritakse uuritav aine sobivas kandjas. Muude kandeainete kui vee puhul peavad olema teada imendumismadused ja võimalik koostoime katseainega.

▼B**1.4.7. Nahale kandmine**

Nahapinnal määratakse pealekandmise kohana kindlaks konkreetse suurusega ala. Teadaolev uuritava valmistise kogus kantakse seejärel ühtlaselt sellele alale. See kogus peaks reeglina järele aimama võimalikku kokkupuudet inimesel, tavaliselt 1–5 mg/cm² tahkete ainete või kuni 10 µl/cm² vedelike puhul. Muid koguseid tuleb põhjendada eeldatavate kasutamistingimuste, uuringu eesmärkide või uuritava valmistise füüsikaliste omadustega. Pealekandmise järel tuleb seda kohta kaitsta, et loom ei saaks seda puhastada. Tüüpilise vahendi näide on esitatud joonisel 1. Tavaliselt kaitstakse pealekandmiskohta mittetiheda kattega (nt õhku läbilaskev nailonmarlist kate). Ent piiramatult annuse puhul tuleb pealekandmiskoht katta tiheda kattega. Kui pooleldi lenduva uuritava aine aurumine vähendab katseaine määramissaagist liiga palju (vt ka punkti 1.4.10 esimest lõiku), on aunud aine vaja kinni püüda pealekandmisvahendi aktiivsöest filtrisse (vt joonis 1). On oluline, et vahend ei kahjustaks nahka, seoks katseainet ega reageeriks sellega. Loomad pannakse tagasi metabolismi uurimise üksikpuuridesse väljaheidete kogumiseks.

1.4.8. Kokkupuute kestus ja proovide võtmine

Kokkupuute kestus on ajavahemik uuritava aine pealekandmise ja nahalt pesemise teel eemaldamise vahel. Tuleb kasutada sobivat kokkupuuteaega (tavaliselt 6 või 24 tundi), arvestades inimese kokkupuute eeldatavat kestust. Kokkupuuteaja järel hoitakse loomi metabolismi uurimise puurides kuni planeeritud lõpetamisajani. Loomi tuleb jälgida toksilisuse/ebanormaalsete reaktsioonide suhtes korrapäraste ajavahemike järel kogu uuringu jooksul. Kokkupuuteaja lõpus tuleb nahka vaadelda nähtavate ärritusnähtude suhtes.

Metabolismi uurimise puurid peavad võimaldama uriini ja rooja eraldi kogumist uuringu jooksul. Need peavad võimaldama ka ¹⁴C-süsinikdioksiidi ja lenduvate ¹⁴C-süsinikühendite kogumist, mida tuleb analüüsida, kui neid tekib suures koguses (> 5 %). Uriin, roe ja kogumisseadmesse jäänud gaasid (nt ¹⁴C-süsinikdioksiid ja lenduvad ¹⁴C-süsinikühendid) tuleb koguda eraldi igalt rühmalt igal proovide võtmise ajal. Kui on piisavalt teavet selle kohta, et lenduvat radioaktiivset metaboliiti tekib vähe või üldse mitte, võib kasutada avatud puure.

Väljaheiteid kogutakse kokkupuuteperioodi ajal, kuni 24 tundi pärast esmast nahakontakti ja seejärel iga päev kuni katse lõpuni. Kolmest väljaheidete kogumise ajavahemikust tavaliselt piisab, ent valmistise uurimise eesmärke või olemasolevaid kineetikaandmeid arvestades võib valida uuringu jaoks sobivamaid või täiendavaid aegu.

Kokkupuuteperioodi lõpus eemaldatakse igalt loomalt kaitsevahend ja säilitatakse eraldi analüüsimise jaoks. Uuritava valmistisega kokkupuutes olnud nahka pestakse kõikidel loomadel vähemalt 3 korda puhastusvahendiga, kasutades sobivaid tampoone. Tuleb olla ettevaatlik, et mitte saastada teisi kehaosaid. Puhastusaine peab olema tavaline hügieenis kasutatav aine, nt seebi vesilahus. Lõpuks tuleb nahk kuivatada. Kõik tamponid ja pesuvesi tuleb säilitada analüüsimise jaoks. Seejärel tuleb paigaldada värske kate, et kaitsta kokkupuutes olnud pinda neil loomadel, kes kuuluvad hilisemale ajale vastavatesse rühmadesse, enne kui loomad pannakse tagasi üksikpuuridesse.

▼B**1.4.9. Katse lõpetamine**

Igas rühmas surmatakse loomad planeeritud ajal ja veri kogutakse analüüsimiseks. Kaitsevahend või kate tuleb analüüsimise jaoks eemaldada. Igalt loomalt eemaldatakse analüüsimiseks kokkupuutekoha nahkja sama suur püगतud nahapind, mis uuritava valmistisega kokku ei puutunud. Kokkupuutekoha naha võib jagada osadeks, eraldades sarvkihi selle all olevast epidermisest, et saada rohkem teavet uuritava kemikaali paiknemise kohta. Uuringud, kuidas kemikaali kogused naha osades muutuvad pärast kokkupuuteperioodi mööduva aja jooksul, peaksid andma ettekujutuse sellest, mis juhtub uuritava kemikaaliga sarvkihis. Naha osadeks jagamise hõlbustamiseks (pärast naha lõplikku pesemist ja looma surmamist) eemaldatakse kaitsekate. Kokkupuutekoha nahk koos rõngakujulise tüki ümbritseva nahaga lõigatakse roti seljast maha ja kinnitatakse alusele. Kleeplindiriba vajutatakse ettevaatlikult naha pinnale ja tõmmatakse siis ära koos osaga sarvkihist. Naha pinnale vajutatakse järjest üha uusi kleeplindiribasid ja tõmmatakse ära, kui kogu sarvkiht on eemaldatud, ei jää riba enam nahapinnale kinni. Iga looma kõik ribad võib panna ühte anumasse, kuhu sarvkihi lahustamiseks lisatakse kudesid lahustavat ainet. Võimalikud sihtkoed võib eemaldada eraldi mõõtmiseks, enne kui ülejäänud korjust analüüsitakse imendunud koguse määramiseks. Üksikloomade korjused säilitatakse analüüsimiseks. Tavaliselt piisab üldsisalduse määramisest. Sihtorganid võib eemaldada eraldi analüüsimiseks (kui see on näidustatud teiste uuringute alusel). Planeeritud surmamise ajal põies leiduv uriin tuleb lisada varem kogutud uriinile. Pärast väljaheidete kogumist metabolismi uurimise puuridest planeeritud surmamise ajal pestakse puurid ja kogumisseadmed sobiva lahustiga. Tuleb uurida ka muud varustust, mis võib olla saastunud uuritava ainega.

1.4.10. Määramine

Kõigis uuringutes tuleb püüda täieliku määramissaagise poole (st saagis peaks olema keskmiselt 100 ± 10 % radioaktiivsusest). Kui saagis jääb väljapoole seda vahemikku, siis tuleb seda põhjendada. Igas proovis kasutatud kogust tuleb analüüsida sobival valideeritud meetoditega.

Statistiliste arvutustega tuleb määrata iga pealekandmiskatse paralleelkatsete dispersioon.

2. ANDMED

Iga looma puhul tuleb igal proovide võtmise ajal teha järgmised uuritava kemikaali ja/või metaboliitide mõõtmised. Lisaks individuaalsetele andmetele tuleb esitada ka proovide võtmise aja alusel rühmitatud andmete keskvaartused.

— kaitsevahenditega seotud kogused;

— nahalt eraldatavad kogused;

— kogused nahas/nahal, mida ei saa nahalt ära pesta;

▼B

- kogus uurimiseks võetud veres;
- kogus väljaheidetes ja väljahingatud õhus (vajadusel);
- kogus, mis jääb korjusesse ja eraldi analüüsimise jaoks eemaldatud organitesse.

Uuritava aine ja/või metaboliitide kogus väljaheidetes, väljahingatud õhus, veres ja korjuses võimaldab määrata igal ajahetkel imendunud aine üldkoguse. Samuti saab arvutada uuritava kemikaali koguse, mis absorbeerus uuritava ainega kokkupuutunud naha 1 cm² kohta kokkupuuteperioodi vältel.

3. TULEMUSTE VORMISTAMINE

3.1. KATSEPROTOKOLL

Katseprotokollis tuleb esitada katse läbiviimisele seatud nõuded, sealhulgas kasutatud katsesüsteemi põhjendus, ning järgmine teave.

Uuritav aine:

- andmed aine määramiseks [nt CASi number, kui see on teada; aine tootja; puhtus (radiokeemiline puhtus); teadaolevad lisandid; partii number];
- füüsikaline iseloomustus, füüsikalised-keemilised omadused (nt pH, lenduvus, lahustuvus, stabiilsus, molekulmass ja log P_{ow}).

Uuritav valmistis:

- koostis ja kasutamise põhjendus;
- üksikasjad uuritava valmistise kohta, pealekantud kogus, saavutatud kontsentratsioon, kandeaine, stabiilsus ja homogeensus.

Katseloom:

- kasutatud liik/aretusliin;
- loomade arv, vanus ja sugu,
- loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;
- üksikloomade kaal katse alguses.

Katsetingimused:

- uuritava valmistise manustamise üksikasjad (pealekandmiskoht, määramismeetod, katmine tihedalt või mittetihedalt, maht, ekstraheerimine, määramine);
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad.

Tulemused:

- kõik toksilisuse nähud;
- tabel imendumisandmete kohta (väljendatud kiiruse, koguse või protsendina);

▼B

- katse üldised määramissaagised;
- tulemuste tõlgendamine, võrdlus katseaine nahakaudse imendumise seniste andmetega.

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

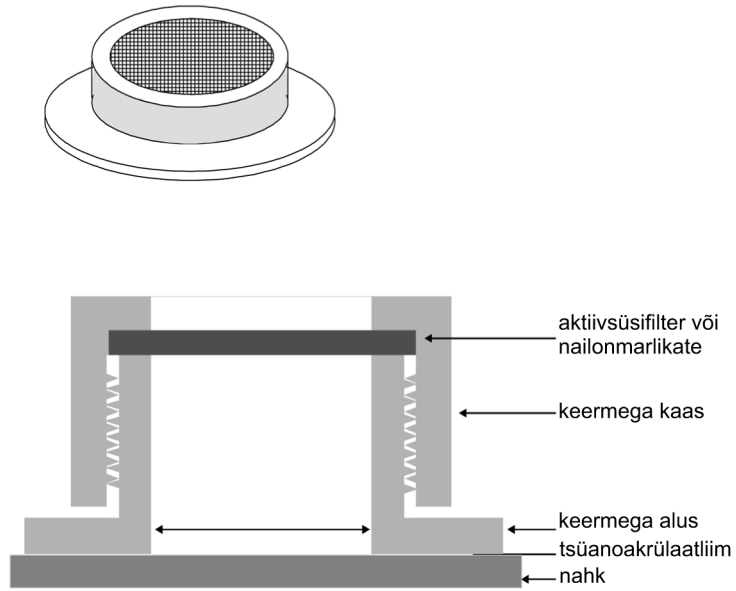
4.

VIITED

- 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) Zendian 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, Pesticides and Toxic Substances.
- 8) Bronaugh RL, Wester RC, Bucks D, Maibach HI and Sarason R (1990) *In vivo* percutaneous absorption of fragrance ingredients in rhesus 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*Joonis 1*

Tüüpiline vahend nahakaudse kokkupuute koha määratlemiseks ja kaitsmiseks *in vivo* nahakaudse imendumise uuringute ajal



▼B

B.45. NAHAKAUDNE IMENDUMINE: *IN VITRO* MEETOD

1. MEETOD

Käesolev katsemeetod vastab suunisele OECD TG 428 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesoleva meetodiga määratakse väljalõigatud nahatükile kantud uuritava aine imendumist läbi naha. Seda võib kasutada kas koos naha kaudu imendumise *in vivo* meetodiga (1) või iseseisvalt. Sel meetodil põhinevate uuringute kavandamise hõlbustamiseks soovitatakse kasutada OECD juhenddokumenti nahakaudse imendumise uuringute läbiviimiseks (2). Juhenddokument on ette valmistatud, et lihtsustada sobivate *in vitro* protseduuride valimist konkreetsete tingimuste puhul, et tagada selle meetodiga saadud tulemuste usaldusväärsus.

Nahakaudse imendumise ja dermaalse jaotumise mõõtmise meetodid võib jagada kahte kategooriasse: *in vivo* ja *in vitro*. Nahakaudse imendumise *in vivo* meetodeid kasutatakse laialdaselt ja nende abil saadakse farmakoloogilist teavet mitme loomaliigi kohta. *In vivo* meetodit kirjeldatakse eraldi teise katsemeetodi juures (1). Ka *in vitro* meetodeid on juba palju aastaid kasutatud nahakaudse imendumise mõõtmiseks. Kuigi käesoleva katsemeetodiga hõlmatud *in vitro* meetodeid pole ametlikult uuringutega valideeritud, leppisid OECD eksperdid 1999. aastal kokku, et hinnatud andmeid on *in vitro* meetodi toetamiseks piisavalt (3). Täiendavad üksikasjad, mis seda kinnitavad, sealhulgas ka palju *in vitro* ja *in vivo* meetodite otseseid võrdlusi, on esitatud juhenddokumendis (viide 2). Käesolevat teemat on käsitletud mitmes monograafia, milles on üksikasjalikult kirjeldatud *in vitro* meetodi kasutamise tausta (4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ja 12). *In vitro* meetoditega mõõdetakse kemikaalide difusiooni nahasse ja läbi naha vedelikureservuaari ning seejuures võib kasutada kas mitteelujõulist nahka ainult difusiooni mõõtmiseks või värsket, metaboolset aktiivset nahka, et mõõta samaaegselt nii difusiooni kui ka metabolismi nahas. Selliseid meetodeid on kasutatud sõeluuringutes mitmesugustest segudest kemikaalide nahka ja läbi naha imendumise võrdlemisel ning need võivad olla ka kasulikeks mudeliteks läbi naha toimuva imendumise hindamiseks inimesel.

In vitro meetod ei pruugi olla kohaldatav igas olukorras ja kõigi kemikaaliklasside puhul. *In vitro* meetod võib sobida naha läbitavuse esialgseks kvalitatiivseks hindamiseks. Mõnikord on neid andmeid vaja täiendada *in vivo* andmetega. Juhenddokumendis (2) on täpsustatud, millal võib kasutada *in vitro* meetodit. Viites 3 on esitatud täiendav üksikasjalik teave sellekohase otsuse põhjendamiseks.

Käesolevas meetodis esitatakse nahakaudse imendumise ja jaotumise mõõtmise üldpõhimõtted väljalõigatud nahatüki kasutamisel. Võib kasutada palju imetajaliikide, kaasa arvatud inimese nahka. Naha läbitavusega seotud omadused säilivad pärast kehalt eemaldamist, kuna peamiseks difusioonibarjääriks on eluvõimetu sarvkiht (*stratum corneum*); aktiivset kemikaalide transporti läbi naha ei ole täheldatud. On tõendatud, et nahal on võime metaboli seerida teatud kemikaale nahakaudse imendumise ajal (6); see protsess ei ole küll kiirust limiteeriv tegelikult imendunud kemikaalidoguse seisukohast, kuid võib mõjutada vereringesse sattuva materjali koostist.

▼B

1.2. MÕISTED

Imendumata kogus – kogus, mis pestakse maha naha pinnalt pärast kokkupuudet ja mis leidub difusiooniraku peal asuval kattel, sealhulgas kogus, mille kohta näidatakse, et see lendub nahalt kokkupuute ajal.

Imendunud kogus (*in vitro*) – katseaine mass, mis jõuab vastuvõtvasse vedelikku või süsteemsesse ringesse konkreetse ajavahemiku jooksul.

Imendatav kogus (*in vitro*) – kogus, mis jääb nahale või naha sisse pärast pesemist.

1.3. KATSEETODI PÕHIMÕTE

Katseaine, mis võib olla radioaktiivselt märgistatud, kantakse kahte difusiooniraku kambrit eraldava nahatüki pinnale. Kemikaal jääb nahale katseprotokollis näidatud ajaks seal kirjeldatud tingimustes, misjärel see eemaldatakse sobiva puhastamisprotseduuriga. Vastuvõtvast vedelikust võetakse katse käigus proovid teatud ajahetkedel ja analüüsitakse neid uuritava kemikaali ja/või metaboliitide suhtes.

Kui kasutatakse metaboolselt aktiivseid süsteeme, võib sobivate meetoditega analüüsida uuritava kemikaali metaboliite. Katse lõpus mõõdetakse vajadusel uuritava kemikaali ja selle metaboliitide jaotumine.

Sobivates tingimustes, mis on kirjeldatud käesoleva meetodi juhendis ja juhenddokumendis (2), mõõdetakse uuritava aine imendumine teatava ajavahemiku vältel, analüüsides vastuvõtvat vedelikku ja nahka, millele oli kantud kemikaal. Naha sisse jäävat uuritavat ainet tuleb käsitada imendununa, välja arvatud juhtudel, kui saab näidata, et imendumist saab määrata ainult vastuvõtva vedeliku väärtuste abil. Teiste komponentide (nahalt maha pestud ja nahakihtidesse jäänud materjal) analüüsimine võimaldab andmeid täiendavalt hinnata, sealhulgas määrata kogu uuritava aine jaotumise ja saagise protsendi.

Katse läbiviimise korrektsuse ja usaldusväärsuse tõendamiseks viiakse laboris läbi katsed asjaomaste võrdluskemikaalidega; saadud tulemused peavad vastama kasutatud meetodi kohta avaldatud kirjandusandmetele. Selleks võib mõõta sobivat võrdlusainet (mille lipofiilsus võiks olla lähedane uuritava aine omale) samaaegselt uuritava ainega või esitada piisav hulk varasemaid andmeid erineva lipofiilsusega võrdlusainete (nt kofeiin, bensoehape ja testosteroon) imendumise mõõtmise kohta.

1.4. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.4.1. Difusioonirakk

Difusioonirakk koosneb doonorkambrist ja vastuvõtukambrist, mille vahele paigutatakse nahk (tüüpilise kujundusega rakk on kujutatud joonisel 1). Rakuseina ja nahatüki ühenduskoht peab olema tihe, naha alumise pinnaga kontaktis olevast vastuvõtvast lahusest peab saama kergesti proove võtta ja seda lahust peab saama korralikult segada ning raku ja selle sisu temperatuur peab olema hästi kontrollitav. Kasutada võib nii staatilist kui ka läbivooluga difusioonirakku. Tavaliselt jäetakse doonorkamber uuritava aine lõpliku kogusega kokkupuute ajal tihedalt sulgemata. Doonorkambri võib aga pideva pealekandmisega katse ja teatavate lõplike kogustega korraldatavate katsete ajal ka tihedalt sulgeda.

▼B**1.4.2. Vastuvõttev vedelik**

Eelistatakse füsioloogilisele keskkonnale lähedase vastuvõtva vedeliku kasutamist, kuid kasutada võib ka muid vedelikke, kui see on põhjendatud. Tuleb esitada vastuvõtva vedeliku täpne koostis. Tuleb näidata, et uuritav kemikaal on vastuvõtvas vedelikus piisavalt lahustuv, nii et see vedelik ise ei takistaks imendumist. Lisaks ei tohi vastuvõttev vedelik nahatükki kahjustada. Läbivooluga süsteemi puhul ei tohi voolukiirus takistada uuritava aine difusiooni vastuvõtvasse vedelikku. Staatilise rakuga süsteemis tuleb vedelikku pidevalt segada ja sealt regulaarselt proove võtta. Kui uuritakse metabolismi, peab vastuvõttev vedelik toetama naha elutegevust katse ajal.

1.4.3. Nahapreparaadid

Võib kasutada inimeselt või loomalt võetud nahka. Inimese naha kasutamine toimub muidugi vastavalt iga riigi ja rahvusvaheliste eetilistele tõekspidamistele ja tingimustele. Kuigi eelistatakse elusat nahka, võib kasutada ka mitteelusat nahka, kui saab näidata, et see ei ole kahjustatud. Lubatav on kasutada kas epidermaalembraane (ensümaatilisel, kuumusega või keemiliselt eraldatud) või dermatoomi abil saadud õhukest nahakihti (paksusega harilikult 200–400 µm). Võib kasutada täispaksusega nahka, kuid liigset paksust ($ca > 1$ mm) tuleb vältida, kui eesmärk ei ole määrata uuritava kemikaali nahakihtides. Loomaliigi, anatoomilise lokaliseerimise ja preparatsioonitehnika valik peab olema põhjendatud. Nõutavad on usaldusväärsed andmed vähemalt neljast paralleelproovist uuritava preparaadi kohta.

1.4.4. Nahapreparaadi kahjustamatus

On oluline, et nahk oleks õigesti prepareeritud. Vale prepareerimine võib kahjustada *stratum corneum*'i, seepärast tuleb kontrollida, et prepareeritud nahk ei oleks kahjustatud. Kui uuritakse naha metabolismi, tuleb kasutada värskest lõigatud nahka võimalikult kiiresti pärast lõikamist ja tingimustes, mis teadaolevalt toetavad metaboolset aktiivsust. Üldreeglina tuleb värskest lõigatud nahka kasutada 24 tunni jooksul, kuid vastuvõetav säilitusperiood võib oleneda metaboolseerivast ensüümsüsteemist ja säilitustemperatuuridest (13). Kui nahapreparaate on enne kasutamist säilitatud, tuleb tõendada, et barjäärifunktsioon on alles.

1.4.5. Uuritav aine

Uuritav aine on aine, mille läbitungimisvõimet uuritakse. Väga hea oleks, kui uuritav aine oleks radioaktiivselt märgistatud.

1.4.6. Uuritav preparaat

Uuritava aine preparaat (st puhas, lahjendatud või segu koostisse viidud materjal, mis sisaldab nahale kantavat uuritavat ainet) peab olema sama, millega inimene või muu loomaliigi esindaja võib kokku puutuda (või selle lähedane aine). Iga kõrvalekaldumine „kasutusel olevast” preparaadist peab olema põhjendatud.

▼B**1.4.7. Uuritavate ainete kontsentratsioon ja segud**

Tavaliselt kasutatakse mitut uuritava aine kontsentratsiooni, mis on võrreldavad suurima kontsentratsiooniga, millega inimene võib kokku puutuda. Samuti tuleb kaaluda tüüpiliste segude imendumise uurimist.

1.4.8. Kandmine nahale

Inimese harilike kokkupuutetingimuste puhul on tavaliselt tegu lõplike kogustega. Seepärast tuleb nahale kanda kogus, mis modelleerib inimese kokkupuudet ainega, ja see on tavaliselt 1–5 mg/cm² naha kohta tahkete ainete ja kuni 10 µl/cm² vedelike puhul. Kogus peaks olema põhjendatud eeldatavate kasutamistingimuste, uuringu eesmärkide või uuritava preparaadi füüsikaliste omadustega. Näiteks võib naha pinnale kantud koguse lugeda lõpmata suureks, kui uuritavat ainet kantakse pindalaühikule suures mahus.

1.4.9. Temperatuur

Temperatuur mõjutab kemikaalide passiivset difusiooni (ja seetõttu nende nahakaudset imendumist). Difusioonikambrit ja nahka tuleb hoida konstantsel temperatuuril, mis on sarnane naha normaalse temperatuuriga 32 ± 1 °C. Erineva kujundusega mõõtmisrakkude puhul on vaja kasutada erinevaid veevanni või soojendatava ploki temperatuure, et tagada vastuvõtva lahuse/naha olek füsioloogilise normi juures. Niiskus peab eelistatavalt olema 30 % ja 70 % vahel.

1.4.10. Kokkupuute kestus ja proovide võtmine

Nahk võib uuritava preparaadiga kokku puutuda kogu katse ajal või lühemate ajavahemike jooksul (et modelleerida inimese kokkupuute mõnd konkreetset tüüpi). Liigne uuritava preparaadi kogus pestakse nahalt sobiva puhastusainega ja loputusvesi kogutakse analüüsimeks. Uuritava preparaadi eemaldamise viis sõltub oodatavatest kasutustingimustest ning peab olema põhjendatud. Tavaliselt on imendumisprofiili piisavaks kirjeldamiseks vaja võtta proove 24 tunni jooksul. Kuna naha kvaliteet võib 24 tunni pärast hakata langema, ei tohi proove tavaliselt võtta kauem kui 24 tunni jooksul. Kiiresti naha sisse tungivate uuritavate ainete puhul ei pruugi pikem mõõtmine olla vajalikki, aeglasemalt naha sisse tungivate ainete puhul võib olla vaja kasutada pikemat aega. Vastuvõtvas vedelikust proovide võtmise sagedus peab olema piisav, et uuritava aine imendumise profiili saaks esitada graafiliselt.

1.4.11. Katse lõpus tehtavad mõõtmised

Kõik katsesüsteemi komponendid tuleb analüüsida ja määrata uuritava aine kogused. See hõlmab doonorkambrit, naha pinna loputusvedelikku, nahapreparaati ja vastuvõtva vedeliku kambrit. Mõnel juhul võib eraldi analüüsime jaoks jagada naha eksponeeritud nahapinnaks ja nahaks, mis paiknes raku ääre all, ning *stratum corneum*iks, epidermiseks ja dermiseks.

1.4.12. Analüüsimine

Kõigis uuringutes tuleb saavutada piisav saagis (eesmärk peaks olema, et keskmine saagis on 100 ± 10 % radioaktiivsusest ja kõrvalkaldd sellest peavad olema põhjendatud). Uuritava aine kogused vastuvõtvas vedelikus, naha pesemise vedelikus ja aparadi loputamise vedelikus tuleb määrata sobiva meetodi abil.

▼B2. **ANDMED**

Esitatakse vastuvõtva vedeliku analüüs, uuritava kemikaali jaotus katsesüsteemis ja imendumisprofiil sõltuvana ajast. Kui kasutatakse lõplikule kogusele vastavaid kokkupuutetingimusi, tuleb arvutada kogus, mis pesti nahalt ära, nahaga (sh eri nahakihtidega, kui neid analüüsitakse) seotud kogus ja vastuvõtvas vedelikus olev kogus (kiirus ja kogus või protsent pealekantud kogusest). Mõnikord saab nahakaudset imendumist väljendada ainult vastuvõtva vedeliku andmete kasutamiseks. Kui katseaine jääb uuringu lõpus naha sisse, võib siiski olla vajalik arvestada ka see kogus imendunud koguse hulka (vt viide 3, punkt 66). Kui kasutatakse lõpmatule kogusele vastavaid kokkupuutetingimusi, võivad andmed võimaldada läbilaskvuskonstandi (K_p) arvutamist. Nende tingimuste puhul pole imendumise protsent oluline.

3. **ARUANDLUS**3.1. **KATSEARUANNE**

Katsearuandes tuleb esitada katse läbiviimisele seatud nõuded, sealhulgas kasutatud katsesüsteemi põhjendus, ning lisaks järgmine teave.

Uuritav aine:

- füüsikaline iseloomustus, füüsikalised-keemilised omadused (vähemalt molekulmass ja $\log P_{ow}$), puhtus (radiokeemiline puhtus);
- identifitseerimiseks vajalikud andmed (nt partii number);
- lahustuvus vastuvõtvas vedelikus.

Uuritav preparaat:

- koostis ja kasutamise põhjendus;
- homogeensus.

Katse tingimused:

- naha päritolu ja lokaliseerimine, preparaerimise meetod, säilitustingimused enne kasutamist, mis tahes eeltöötlus (puhastamine, antibiootiline töötlus jne), naha kahjustamatuse mõõtmised, metaboolne staatus, kasutamise põhjendus;
- difusiooniraku ehitus, vastuvõtva vedeliku koostis, vastuvõtva vedeliku voolukiirus või proovide võtmise ajad ja meetod;
- uuritava preparaadi pealekandmise üksikasjad ja pealekantud kogus;
- kokkupuute kestus;
- uuritava preparaadi nahalt eemaldamise, nt naha loputamise üksikasjad;
- naha analüüsi üksikasjad ja millist fraktsioneerimistehnikat kasutati, et määrata jaotumine nahas;

▼B

- raku ja varustuse pesemise kord;
- analüüsimeetodid, ekstraheerimistehnika, avastamisiirid ja analüüsimeetodi valideerimine.

Tulemused:

- uuritava aine üldised määratud kogused katses (pealekantud kogus = naha pesuvedelik + nahk + vastuvõttev vedelik + raku pesuvedelik);
- tabel mõõdetud koguste kohta raku igas kambris;
- imendumisprofiil;
- imendumist iseloomustavate andmete tabel (väljendatud kiiruse, koguse või protsendina).

Tulemuste arutelu.

Järeldused.

4. VIITED

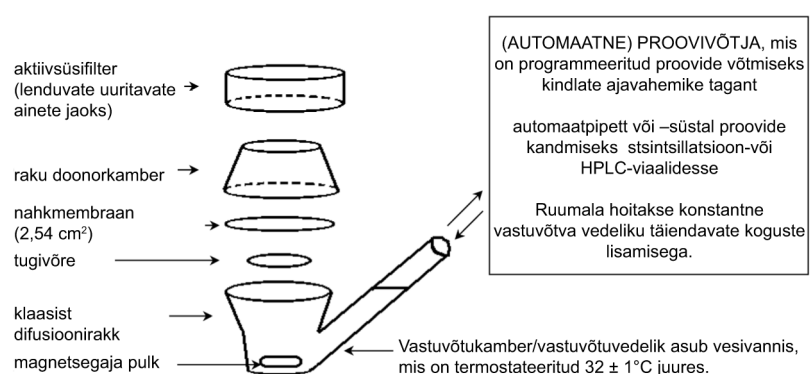
- 1) Testing Method B.44. Skin Absorption: *In vivo* Method.
- 2) OECD (2002). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. OECD, Paris.
- 3) OECD (2000). Report of the Meeting of the OECD Extended Steering Committee for Percutaneous Absorption Testing, Annex 1 to ENV/JM/TG(2000)5. OECD, Paris.
- 4) Kempainen BW and Reifenth 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.

Joonis 1

Tüüpilise staatilise difusiooniraku ehitus nahakaudse imendumise *in vitro* uuringute puhul



▼ **M3****B.46. IN VITRO NAHAÄRRITUSKATSE: REKONSTRUEERITUD INIMEPIDERMISE MUDELI KATSEMEETOD**

SISSEJUHATUS

1. Nahaärrituse all mõistetakse pöörduva nahakahjustuse tekitamist uuritava kemikaali pealekandmisega neljaks tunniks (nagu on määratletud ÜRO ühtses ülemaailmses kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemis (GHS) ning Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määruses (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist (edaspidi „CLP-määrus“ (*classification, labelling and packaging*)) (1, 3)). Käesolevas katsemeetodis on kirjeldatud *in vitro* meetodit, mida võib kasutada ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse 2. kategooriale vastavate ärritavate ainete seotud ohtude kindlaksmääramiseks (1, 2, 3). ELis ja muudes piirkondades, milles ei ole vastu võetud vabatahtlikult kohaldatavat ÜRO GHSi 3. kategooriat (nõrgad ärritajad), võib käesolevat katsemeetodit kasutada ka selleks, et kindlaks teha klassifitseerimata, st ÜRO GHSi ja ELi CLP-määruse kohase kategooriata kemikaale (1, 3). Käesolevat katsemeetodit võib kasutada kemikaalide nahaärritust tekitava toime määramiseks kui iseseisvat meetodit, millega saab asendada *in vivo* nahaärrituse mõõtmise astmelise katsetamise strateegias (4 ja käesoleva lisa peatükk B.4).

2. Nahka ärritava toime hindamisel on tavaliselt kasutatud laboriloomi (OECD katsejuhend 404; käesoleva lisa peatükk B.4) (4). Loomade heaolu tagamise vajadust arvestades vaadati meetod B.4 2004. aastal läbi ja lubati nahka söövitavat või ärritavat toimet määrata astmelise katsetamise strateegiaga, milles kasutatakse valideeritud *in vitro* ja *ex vivo* meetodeid, et vältida loomadele valu ja kannatuste põhjustamist. Kolm valideeritud *in vitro* katsemeetodit on kinnitatud kui OECD katsejuhendid 430, 431 ja 435 (5, 6, 7) ning kaks neist kui käesoleva lisa peatükid B.40 ja B.40a, et neid kasutataks astmelise katsetamise strateegia B.4 või OECD katsejuhendi 404 (4) kasutamisel söövitust põhjustava toime määramiseks.

3. Käesolevas katsemeetodis on käsitletud inimtervise sellist aspekti nagu nahaärritus. Meetodis on kasutatud rekonstrueeritud inimepidermist (RhE), mis oma üldise ülesehituse poolest (rakkude allikana on nendes kasutatud inimepidermisest saadud transformeerimata keratinotsüüte, mudelil on epidermisesarnane kude ja rakuarhitektuur) jäljendab nii oma biokeemiliste kui ka füsioloogiliste omaduste poolest inimnaha ülemisi kihte, st epidermist. Käesolev katsemeetod hõlmab tulemuslikkusnäudeid (2. liide), mille on välja töötanud alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskus (EC-ECVAM) (8) vastavalt OECD suunisdokumendile nr 34 (9) ja mille alusel hinnatakse samalaadseid või muudetud RhE-põhiseid meetodeid.

4. Käesolev katsemeetod hõlmab kolme valideeritud meetodit. Eelvalideerimine, optimeerimine ja valideerimine on lõpetatud *in vitro* meetodi jaoks (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20), milles kasutatakse RhE-mudelit, mida müüakse nimetuse EpiSkinTM all ja millele viidatakse kui valideeritud võrdlusmeetodile. Valideeritud võrdlusmeetodiga sarnaseid tulemusi on tulemuslikkusnäuetel põhineva hindamise (21) kohaselt saadud veel kahe müügil oleva nahaärrituse *in vitro* määramise RhE-põhise meetodiga ning need on RHE-meetodid EpiDermTM SIT (EPI-200) ja SkinEthicTM (22).

▼ M3

5. Enne kui muud samalaadset või muudetud *in vitro* RhE-meetodit peale valideeritud võrdlusmeetodi ja RHE-meetodite EpiDerm™ SIT (EPI-200) või SkinEthic™ võib kasutada regulatiivsel eesmärgil, tuleks määrata selle usaldusväärsus, asjakohasus (õigsus) ja kavandatud kasutamise piirangud, et olla kindel, et seda võib pidada valideeritud võrdlusmeetodiga sarnaseks meetodiks vastavalt käesolevas katsemeetodis (2. liide) esitatud tulemuslikkusnõuetele. Lisaks soovitatakse enne samalaadse või muudetud *in vitro* RhE-meetodi väljatöötamist, valideerimist ja regulatiivseks kinnitamiseks pakkumist tutvuda *in vitro* nahaärrituse määramist käsitleva OECD selgitava taustdokumendiga (23).

MÕISTED

6. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

7. Valideerimisuring (16) näitas, et üks katsemeetodi piiranguid on see, et sellega ei saa klassifitseerida kemikaale vabatahtlikult kohaldatavasse ÜRO GHSi kategooriasse 3 (nõrgad ärritajad) (1). Osaliselt asendava katsemeetodina kasutamisel võib vaja minna järgnevat *in vivo* katset, et täielikult iseloomustada kemikaali nahaärritust tekitavat toimet (4 ja käesoleva lisa peatükk B.4). Inimese naha kasutamine toimub muidugi vastavalt iga riigi ja rahvusvahelistele eetilistele tõekspidamistele ja tingimustele.
8. Käesolevas katsemeetodis käsitletakse B.4 (OECD katsejuhend 404) naha-öövituse/nahaärrituse astmelise katsetamise strateegia (4) *in vitro* nahaärritust tekitavat komponenti. Kuigi see katsemeetod ei anna adekvaatset teavet naha-öövituse kohta, tuleb märkida, et naha-öövituse määramise meetod B.40a (OECD katsejuhend 431) põhineb samal RhE katsesüsteemil, kuigi seal kasutatakse teistsugust eeskirja (peatükk B.40 a). Meetod põhineb RhE-mudelitel, milles kasutatakse inimese keratinotsüüte, mis sellega *in vitro* esindavad meid huvitava liigi sihtorganit. Lisaks hõlmab meetod otseselt kemikaali toimel tekkiva põletiku kaskaadmehhanismi algstaadiumi (raku- ja koekahjustus, millest tekib piiratud ulatusega trauma), mis esineb nahaärrituse tekkimisel *in vivo*. Käesoleva katsemeetodi valideerimiseks on katsetatud paljusid erinevaid kemikaale; valideerimisuringute empiirilises andmebaasis on kokku 58 kemikaali (16, 18, 23). Meetodit saab kasutada tahkete ainete, vedelike, püdelate ainete ja vahade puhul. Vedelikud võivad olla vesilahused või muud vedelikud; tahked ained võivad olla vees lahustuvad või lahustumatud. Tahked ained tuleks enne pealekandmist võimaluse korral peenestada peeneks pulbriks; uuritava aine muud eeltötlust ei ole vaja. Gaase ja aerosooli ei ole valideerimisuringuga veel hinnatud (24). Kuigi on mõeldav, et neidki saab uurida RhE-meetodiga, ei võimalda praegune katse-eeskiri gaaside ega aerosoolide uurimist. Tuleb märkida ka, et tugeva värvusega kemikaalid võivad segada rakkude eluvõimelisuse mõõtmist ja siis on vaja kasutada sobivaid kontrollproove paranduste tegemiseks (vt punktid 24–26).
9. Üksainus katse kudede kolme paralleelprooviga peaks olema piisav uuritava kemikaali klassifitseerimiseks, kui tulemus on ühene. Piiripealse tulemuse puhul, nagu lahkuminevad tulemused paralleelide mõõtmisel ja/või keskmine eluvõimelisuse protsent $50 \pm 5\%$, võib vaja minna teist katset, samuti kolmandat katset, kui kaks esimest katset annavad vastuolulise tulemuse.

▼ M3

KATSE PÕHIMÕTE

10. Uuritav kemikaal kantakse kolmemõõtmelisele RhE mudelile, mis koosneb inimepidermisest saadud transformeerimata keratinotsüütidest, mida on kasvatatud nii, et need moodustavad inimepidermise mitmekihilise tugevalt diferentseerunud mudeli. See koosneb korrastatud basaalkihist, ogakihist ja sõmerkihist ning mitmekihilisest sarvkihist (*stratum corneum*), mis sisaldab rakkudevahelisi õhikliidikihte, mille paigutus sarnaneb paigutusega *in vivo*.
11. Kemikaalide tekitatud nahaärritus, mis avaldub punetuse ja tursena, tekib sündmuste kaskaadi tulemusena; kaskaadi alguses tungib kemikaal läbi sarvkihi ja kahjustab selle all asuvaid keratinotsüüdkihite. Surevad keratinotsüüdid vabastavad mediaatoreid, mis päästavad valla põletikureaktsioonide kaskaadi, mis mõjutab pärisnaha (*dermis*) rakke, eelkõige strooma- ja endoteeliumirakke. Endoteeliumirakkude paisumine ja läbilaskvuse suurenemine põhjustab nähtava punetuse ja turse (24). RhE-põhiste meetoditega mõõdetakse kaskaadi vallapäästvaid sündmusi.
12. RhE-mudelis mõõdetakse rakkude eluvõimelisust vitaalvärvaine MTT (3-(4,5-dimetüül-tiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasoolumbromiid, tiasolüülsinine; CASi number 298-93-1)) ensümaatilise muundamise järgi siniseks formaansoolaks, mis pärast koest ekstraheerimist määratakse kvantitatiivselt (25). Ärritavad kemikaalid tehakse kindlaks nende võime järgi vähendada rakkude eluvõimelisust allapoole kindlaksmääratud läviväärtusi (see tähendab ≤ 50 % ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse kohaste 2. kategooria ärritavate ainete puhul). Kemikaalid, millega rakkude eluvõimelisus jääb kõrgemale kindlaksmääratud läviväärtusest (st üle 50 %), võidakse olenevalt regulatiivsest raamistikust, milles katsemeetodi tulemusi kasutatakse, tunnistada mitteärritavaks (kategooriata kemikaal).

PÄDEVUSE TÕENDAMINE

13. Enne käesoleval katsemeetodil põhinevast kolmest valideeritud meetodist mõne meetodi igapäevast kasutuselevõttu peaksid laborid tõendama oma tehnilist pädevust, kasutades tabelis 1 soovitatud kümmet kemikaali. Käesoleva katsemeetodi kolme valideeritud meetodi alusel välja töötatavate samalaadsete või muudetud katsemeetodite puhul tuleks tõendada käesoleva katsemeetodi 2. liites kirjeldatud tulemuslikkusnõuete täitmist, enne kui meetod võetakse kasutusele õigusnormides ette nähtud meetodina.
14. Pädevuse tõendamise osana soovitatakse kasutajal pärast kudede saamist kontrollida nende kaitsekihiomaduste vastavust RhE-mudeli tootja kirjeldusele. See on eriti oluline pärast kudede pikaajalist transporti või transporti suure vahemaa taha. Kui meetod on edukalt omandatud ja oskus seda kasutada on tõendatud, ei ole selle tavapärane kontrollimine vajalik. Kuid tavapärase kasutamise puhul soovitatakse jätkata kaitsekihiomaduste kontrollimist korrapäraste ajavahemike järel.

Tabel 1

Võrdluskemikaalid (1)

Kemikaal	CASi nr	<i>In vivo</i> hinne (2)	Füüsikaline olek	ÜRO GHSi ja ELi CLP-määruse kohane kategooria
naftüüläädikhape	86-87-3	0	tahke	kat-ta
isopropanool	67-63-0	0,3	vedelik	kat-ta

▼ M3

Kemikaal	CASi nr	<i>In vivo</i> hinne ⁽²⁾	Füüsikaline olek	ÜRO GHSi ja ELi CLP-määruse kohane kategooria
metüülstearaat	112-61-8	1	tahke	kat-ta
heptüülbutüraat	5870-93-9	1,7	vedelik	kat-ta (vabatahtlikult kohald. kat. 3) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
heksüülsaltsülaat	6259-76-3	2	vedelik	kat-ta (vabatahtlikult kohald. kat. 3) ⁽³⁾ , ⁽⁴⁾
3- <i>p</i> -kumenüül-2-metüülpropioonaldhüüd	103-95-7	2,3	vedelik	2. kat.
1-bromoheksaan	111-25-1	2,7	vedelik	2. kat.
kaaliumhüdrosiid (5 % vesilahus)	1310-58-3	3	vedelik	2. kat.
1-metüül-3-fenüül-1-piperasiin	5271-27-2	3,3	tahke	2. kat.
heptanaal	111-71-7	3,4	vedelik	2. kat.

⁽¹⁾ Tabelis esitatud võrdluskemikaalid on osa valideerimisuringus kasutatud võrdluskemikaalidest.

⁽²⁾ Hinne *in vivo*, vastavalt B.4-le ja OECD katsejuhendile 404 (4).

⁽³⁾ Käesoleva katsemetodi kohaselt käsitatakse ÜRO GHS-süsteemi 3. valikkategooriat (nõrgad ärritajad) (1) kategooria puudumisena (kategooriata).

⁽⁴⁾ ÜRO GHS-süsteemi 3. valikkategooria ei ole ELi CLP-määruse järgi kohaldatav.

KATSE KÄIK

15. Järgnevas osas kirjeldatakse nahaärrituse hindamiseks kasutatava RhE-metodi katse osi ja teostust. Tuleb valmistada RhE-mudel; selle võib teha kas ise või osta. Avaldatud on standardtööeeskirjad kolme mudeli jaoks: EpiSkinTM, EpiDermTM SIT (EPI-200) ja SkinEthicTM RHE (26, 27, 28). Katse tuleks teha järgmiselt.

RhE katsemetodi osad

Üldtingimused

16. Epiteelkoe ehitamiseks tuleb kasutada inimese transformeerimata keratinotsüüte. Talitleva sarvkihi all peab olema mitu kihti (basaalkiht, ogakiht ja sõmerkiht) eluvõimelisi epiteelrakke. Sarvkiht peaks olema mitmekihiline ja vajaliku lipiidse koostisega, et tekiks sellise tugevusega funktsionaalne kaitsekiht, mis suudab takistada tsütotoksiliste markerkemikaalide, nagu naatriumdodetsüülsulfaat (SDS) või Triton X-100, kiiret läbitungimist. Nimetatud kaitsekihina toimimist tuleks tõendada kas sellise kontsentratsiooni määramisega, mille juures markerkemikaal vähendab koe eluvõimelisust 50 % võrra (IC₅₀) pärast kindlaksmääratud kokkupuuteaega, või sellise kokkupuuteaja määramisega, mille juures markerkemikaal teatava kindla kontsentratsiooni juures vähendab koe eluvõimelisust 50 % võrra (ET₅₀). RhE mudel peab olema selline, et aine ei saaks tungida eluskudedesse sarvkihist mööda minnes, vastasel korral ei oleks tegemist naha ja keemilise aine kokkupuute õige mudeliga. RhE mudel ei tohi olla saastunud bakterite, viiruste, mükoplasma ega seentega.

▼ **M3***Funktsionaalsed tingimused*

Eluvõimelisus

17. Eluvõimelisuse määramiseks kasutatakse värvaine MTT katset (25). RhE-mudeli kasutajad peaksid tagama, et iga kasutatav RhE partii vastab kindlaksmääratud negatiivse kontrolli kriteeriumidele. Puhta ekstraheerimislahusti optiline tihedus peab olema piisavalt madal, väiksem kui 0,1. Negatiivse kontrolli optilise tiheduse lubatav vahemik (ülem- ja alampiir) (nahaärrituse katsemeetodi tingimustes) määratakse RhE-mudeli valmistaja või tarnija poolt; kolme valideeritud meetodi lubatavad vahemikud on esitatud tabelis 2. Peaks olema tõendatud, et negatiivse võrdlusainega töödeldud kude on kultuuris stabiilne (võimaldab saada samalaadseid eluvõimelisuse mõõtmistulemusi) katses kasutatava kokkupuuteaja jooksul.

Tabel 2

Negatiivse kontrolli optilise tiheduse lubatav vahemik

	Lubatav alampiir	Lubatav ülempiir
EpiSkin™ (SM)	≥ 0,6	≤ 1,5
EpiDerm™ SIT (EPI-200)	≥ 1,0	≤ 2,5
SkinEthic™ RHE	≥ 1,2	≤ 2,5

Toimimine kaitsekihina

18. Sarvkiht ja selle lipiidne koostis peavad olema piisavad, et takistada tsütotoksiliste markerkemikaalide, nagu SDS või Triton X-100, kiiret läbitungimist; seda hinnatakse IC₅₀ või ET₅₀ abil (tabel 3).

Morfoloogia

19. RhE-mudelit tuleb histoloogiliselt uurida ja tõendada, et sel on inimese epidermisega sarnane struktuur (sealhulgas mitmekihiline sarvkiht).

Reprodutseeritavus

20. Katsemeetodi positiivse kontrolli kemikaalide ja negatiivse kontrolli tulemused peavad olema ajas reprodutseeritavad.

Kvaliteedikontroll

21. RhE-mudeli valmistaja või tarnija peaks tagama ja tõendama, et kasutatud RhE-mudelite iga partii vastab toote kvaliteedikriteeriumidele, mille hulgas kõige olulisemad on eluvõimelisuse (punkt 17), kaitsekihiomaduste (punkt 18) ja morfoloogiaga (punkt 19) seotud kriteeriumid. Sellised andmed tuleks anda meetodi kasutajate käsutusse, et nad saaksid esitada selle teabe oma katse protokollis. RhE-mudeli valmistaja/tarnija (või katse tegija, kui ta kasutab omatehtud mudelit) peaks kindlaks määrama IC₅₀ või ET₅₀ lubatava vahemiku (ülem- ja alampiiri). Nahaärrituse klassifikatsiooni usaldusväärseks ennustamiseks saab kasutada ainult sobivate omadustega kudede saadud tulemusi. Tabelis 3 on näitena esitatud kolme valideeritud standardmeetodi puhul lubatavad vahemikud.

▼ M3

Tabel 3

Partii kvaliteedi kontrollimise kriteeriumide näited

	Lubatav alampiir	Lubatav ülempiir
EpiSkin™ (SM) (18-tunnine töötlus SDS-ga) (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 tundi	ET ₅₀ = 8,7 tundi
SkinEthic™ RHE (1 % Triton X-100) (28)	ET ₅₀ = 4,0 tundi	ET ₅₀ = 9,0 tundi

Uuritavate ja kontrollkemikaalide pealekandmine

22. Iga uuritava kemikaaliga ja kontrollidega tuleks teha vähemalt kolm paralleelkatset. Vedela ja tahke aine korral tuleb kasutada piisavat uuritava kemikaali kogust, nii et see kataks ühtlaselt naha pinna, kuid vältida tuleb lõpmatut annust, see tähendab, et ainet tuleb peale kanda vähemalt 25 µl/cm² või 25 mg/cm². Tahke aine puhul tuleks epidermist niisutada enne kemikaali pealekandmist deioniseeritud või destilleeritud veega, et parandada uuritava kemikaali kontakti nahaga. Võimaluse korral tuleks tahket ainet alati katsetada peene pulbri kujul. Kokkupuuteaja lõpus tuleks uuritav kemikaal epidermise pinnalt hoolikalt maha pesta vesipuhverlahusega või 0,9 % NaCl lahusega. Olenevalt sellest, millist kolmest valideeritud RhE meetodist kasutatakse, võib kokkupuuteaeg olla 15–60 minutit ja inkubatsioonitemperatuur 20–37 °C. Kõnealuseid kokkupuuteaegu ja -temperatuure optimeeritakse iga RhE-meetodi jaoks ja need peegeldavad iga meetodi eriomadusi; täpsustused on iga meetodi standardtööeeskirjades (26, 27, 28).
23. Iga uuringu puhul tuleb teha paralleelkatsed negatiivse kontrolli võrdlusaine ja positiivse kontrolli võrdlusainega, millega tõendatakse, et kudede eluvõimelisus (negatiivse kontrolli võrdlusaine), kaitsekihitoime ja sellega määratud kudede tundlikkus (positiivse kontrolli võrdlusaine) on varem kindlaksmääratud lubatud piirides. Soovitav positiivse kontrolli võrdlusaine on SDSi 5 % vesilahus. Soovitavad negatiivse kontrolli kemikaalid on vesi või fosfaatpuhvit sisaldav keedusoolalahus.

Raku eluvõimelisuse mõõtmine

24. Kõige olulisem katse tegemisel on see, et eluvõimelisuse mõõtmisi ei tehtaks vahetult pärast kokkupuudet uuritava kemikaaliga, vaid pärast töötlemisele järgnevat puhtaks loputatud kudede piisavalt pikka inkubeerimist värskes keskkonnas. Inkubeerimine võimaldab toimuda nõrgalt tsütotoksilistest mõjudest ja ilmnedal selgel tsütotoksilisel mõjul. Katse optimeerimise-tapis tõendati (11, 12, 13, 14, 15), et 42 tundi töötlemisjärgset inkubeerimist oli optimaalne.
25. MTT-katse on valideeritud kvantitatiivne meetod, mida tuleks käesoleva katsemeetodi puhul kasutada rakkude eluvõimelisuse mõõtmiseks. Meetodit saab kasutada kolmemõõtmelises koekonstruksioonis. Koeproof asetatakse kolmeks tunniks sobiva kontsentratsiooniga (nt 0,3–1 mg/ml) MTT lahusesse. Sadestunud sinine formasaan ekstraheeritakse seejärel lahustiga (näiteks isopropanool, hapestatud isopropanool) ja formasaani kontsentratsioon määratakse optilise tiheduse mõõtmisega lainepikkusel 570 nm, kasutades spektririba laiust kuni ± 30 nm.

▼ M3

26. Uuritava kemikaali enda optilised omadused või selle keemiline mõju MTT-le võib segada määramist, põhjustades eluvõimelisuse hindamisel vea (kuna uuritav kemikaal võib segada värvuse ilmumist, nõrgendada värvust või põhjustada seda). See võib juhtuda, kui uuritavat kemikaali ei ole koelt täielikult maha loputatud või kui kemikaal on tunginud epidermissesse. Kui uuritav kemikaal reageerib otse MTTga (MTT-taandaja), on ise värviline või muutub värviliseks koega kokkupuutumisel, on vaja täiendavaid kontrollkatseid, et teha kindlaks, kuivõrd segab uuritav kemikaal eluvõimelisuse määramist, ning teha vajalik parandus. Üksikasjalik kirjeldus, kuidas teha parandust MTT otsese taandamise arvestamiseks ning värviliste ainete mõju arvessevõtmiseks, on esitatud kolme valideeritud meetodi standardeeskirjades (26, 27, 28).

Katse kehtivuse kriteeriumid

27. Iga meetodi puhul, milles kasutatakse kõlblikku RhE-mudeli partiid (vt punkt 21), peaks negatiivse kontrolli võrdlusainega töödeldud kudede korral leitama optilise tiheduse väärtused, mis näitavad, et koed on pärast transpordi ja vastuvõtmise etappe ning kõiki katse-eeskirjaga ette nähtud töötlusi säilitanud oma kvaliteedi. Kontrollkatsete optilise tiheduse väärtused ei peaks olema allpool varem määratud alampiire. Ka positiivse kontrolli võrdlusainega, st 5 % SDSi lahusega, töödeldud kudedel peaks olema säilinud võime reageerida ärritavale ainele katsemeetodi tingimustes (26, 27, 28). Tuleb määratleda koeproovide varieeruvusega seotud sobivad näitajad (kui kasutatakse näiteks standardhälbeid, peaksid need olema varasematest andmetest arvatud ühepoolse 95 % tolerantsivahemikus; valideeritud võrdlusmeetodi standardhälve on alla 18 %).

Tulemuste tõlgendamine ja ennustumudel

28. Iga uuritava kemikaaliga saadud optilise tiheduse väärtusi saab kasutada selleks, et arvatada rakkude eluvõimelisuse protsent võrreldes normaliseeritud negatiivse kontrolliprooviga, mille eluvõimelisuseks määratakse 100 %. Rakkude eluvõimelisuse protsendimäära piirväärtus, mis eraldab ärritavaid kemikaale klassifitseerimata uuritavatest kemikaalidest, ning statistiline meetod (statistilised meetodid), mida kasutatakse tulemuste hindamiseks ja ärritavate kemikaalide kindlakstegemiseks, peab (peavad) olema selgelt määratletud ja dokumenteeritud ning selle (nende) sobivus peab olema tõendatud. Piirväärtused, mida kasutatakse ärritava toime kindlakstegemiseks, on järgmised:

- uuritavat kemikaali peetakse ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse kohaseks 2. kategooria nahka ärritavaks kemikaaliks, kui koe eluvõime pärast kokkupuudet ja töötlemisjärgset inkubeerimist on väiksem kui 50 % või sellega võrdne;
- olenevalt katsemeetodi tulemuste kasutamise regulatiivsest raamistikust võidakse uuritavat kemikaali pidada nahka mitte ärritavaks ja vastavaks ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse kohasele kategooriata kemikaalile, kui koe eluvõime pärast kokkupuudet ja töötlemisjärgset inkubeerimist on suurem kui 50 %.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

29. Iga katse kohta tuleks tabelina esitada üksikute paralleelproovikudedega saadud tulemused (näiteks optilise tiheduse väärtused ja rakkude eluvõimelisuse arvatud protsendimäära andmed iga uuritud kemikaali kohta, kaasa arvatud klassifikatsioon); samuti tuleb vajaduse korral esitada kordusmäärasmiste andmed. Lisaks keskvärtusele esitatakse iga katse jaoks ka \pm standardhälve väärtused. Iga uuritava kemikaali puhul registreeritakse tähelepanekud selle mõjude kohta MTT-reagendile, samuti märgitakse ära värvilised uuritavad kemikaalid.

▼ **M3***Katseprotokoll*

30. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritavad kemikaalid ja kontrollkemikaalid:

- keemiline nimetus või keemilised nimetused, nagu CASi nimetus ja number, EÜ nimetus ja number, kui on teada;
- kemikaali puhtus või koostis (massiprotsentides);
- määramise seisukohast olulised füüsikalised-keemilised omadused (näiteks füüsikaline olek, stabiilsus, lenduvus, pH, lahustuvus vees, kui on teada);
- uuritava kemikaali / kontrollkemikaali töötlemine enne katset, kui see on asjakohane (nt soojendamine, peenestamine);
- säilitamistingimused.

Kasutatud RhE-mudeli ja katse tegemise käigu põhjendus

Katsetingimused:

- kasutatud rakusüsteem;
- kogu täiendav teave kasutatud konkreetse RhE-mudeli ja selle tulemuslikkuse kohta. See hõlmab vähemalt järgmist:
 - i) eluvõimelisus;
 - ii) toimimine kaitsekihina;
 - iii) morfoloogia;
 - iv) reprodutseeritavus ja ennustamisväärtus;
 - v) mudeli kvaliteedi kontroll;
- katsete meetoodika üksikasjad;
- määramisel kasutatud annused, kokkupuute kestus ja kokkupuutele järgnenud inkubatsiooniaeg;
- kõikide katse-eeskirjas tehtud muudatuste kirjeldus;
- viide varasematele andmetele mudeli kohta. See hõlmab vähemalt järgmist:
 - i) kvaliteedikontrolli andmete kehtivus, arvestades varasemaid partii andmeid;
 - ii) positiivse ja negatiivse kontrolli väärtuste kehtivus, arvestades positiivse ja negatiivse kontrolli keskvärtusi ja vahemikke;
- kasutatud hindamiskriteeriumide kirjeldus, sealhulgas ennustamismudelid kasutamiseks valitud piirväärtus(t)e valiku põhjendus;
- viide varasematele kontrolli andmetele.

▼ **M3**

Tulemused:

- iga üksiku uuritava kemikaaliga igas katses ja igal paralleelmõõtmisel saadud andmete tabel;
- otseste MTT-taandajate ja/või värviliste uuritavate kemikaalide puhul kasutatud kontrollid;
- muude täheldatud toimete kirjeldus.

Tulemuste arutelu

Kokkuvõte

KIRJANDUS

- 1) UN (2009), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Third revised edition, UN New York and Geneva. Vt: 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. Vt: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>
- 3) Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006. ELT L 353, 31.12.2008, lk 1.
- 4) OECD (2004), Acute Dermal Irritation/Corrosion, OECD Guideline for the Testing of Chemicals No. 404, OECD, Paris. Vt: <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. Vt: <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. Vt: <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. Vt: <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)? Vt: <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. Vt: <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 Rubinstein, 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 . Vt: <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-Tessonnaud, 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. Vt: <http://ecvam.jrc.ec.europa.eu>]
- 21) EC-ECVAM (2007), Performance Standards for applying human skin models to *in vitro* skin irritation testing. Vt: <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. Vt: <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. Vt: 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. Vt: <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). Vt: <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. Vt: <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.). McGraw-Hill, New York.
- 30) Komisjoni 6. augusti 2001. aasta direktiiv 2001/59/EÜ, millega kahekümne kaheksandat korda kohandatakse tehnikat arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja mürgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta, EÜT L 225, 21.8.2001, lk 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 Kandarová, 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***1. liide***Mõisted**

Täpsus: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (9).

Rakkude eluvõimelisus: rakupopulatsiooni üldist aktiivust, näiteks raku mitokondrite dehüdrogenaaside võimet taandada vitaalvärvainet MTT (3-(4,5-dimetüül-tiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid, tiasolüülsinine), väljendav parameeter, mis olenevalt mõõdetavast lõpp-punktist ja katseplaani korreleerub elurakkude koguarvu ja/või elujõulisusega.

Vastavus: katsemeetodi tulemuslikkuse näitaja katsemeetodite puhul, millega saadakse kategooriline tulemus, on üks asjakohasuse aspekte. Terminit kasutatakse „täpsuse“ asendustermenina ja määratletakse õigesti positiivseks või negatiivseks klassifitseeritud kemikaalide ja kõikide uuritud kemikaalide suhtarvuna (9).

ET₅₀: hinnatakse sel viisil, et määratakse kokkupuuteaeg, pärast mida markerkemikaali teatava kindla kontsentratsiooni rakendamisel rakkude eluvõimelisus väheneb 50 %; vt ka IC₅₀.

ELi CLP-määrus (Euroopa Parlamendi ja nõukogu 16. detsembri 2008. aasta määrus (EÜ) nr 1272/2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist): selle määrusega rakendatakse Euroopa Liidus (ELis) kemikaalide (ainete ja segude) klassifitseerimise ja märgistamise ÜRO GHS-süsteem (3).

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals by the United Nations) ehk ÜRO ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem: süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud tüübile ja tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogramm, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (1).

IC₅₀: hinnatakse sel viisil, et määratakse kontsentratsioon, mille puhul markerkemikaal vähendab pärast kindlaksmääratud kokkupuuteaega kudede eluvõimelisust 50 %; vt ka ET₅₀.

Lõpmatu annus: epidermisele kantud uuritava kemikaali kogus, mis on suurem epidermise pinna täielikuks ja ühtlaseks katmiseks vajalikust kogusest.

Mina-kah-meetod: kõnekeelne väljend katsemeetodi kohta, mis on struktuuriliselt ja tööpõhimõttelt sarnane valideeritud ja aktsepteeritud võrdlusmeetodiga. Sellist katsemeetodit võib valideerida kiirendatud korras (*catch-up validation*). Kasutatakse vaheldumisi samalaadsete katsemeetodite puhul (9).

Tulemuslikkusnõuded: valideeritud katsemeetodil põhinevad nõuded, mille alusel hinnatakse, kui võrd saab esitatud katsemeetodit võrrelda teostuslikult ja tööpõhimõttelt samalaadse meetodiga. Arvesse võetakse järgmist: i) katsemeetodi olulised osad, ii) valideeritud standardmeetodi tulemuslikkuse tõendamiseks kasutatud kemikaalide hulga valitud võrdluskemikaalide miinimumloend ja iii) võrreldavad täpsuse ja usaldusväärsuse tasemed, mis põhinevad valideeritud katsemeetodiga saadud tulemustel ja mis tuleks kavandatud katsemeetodi hindamisel saavutada võrdluskemikaalide miinimumloendi kasutamisel (9).

▼ **M3**

Võrdluskemikaalid: valideerimisel kasutamiseks välja valitud kemikaalid, mille esilekutsutavad immuunvastused *in vitro* või *in vivo* võrdlussüsteemis või huvipakkuva loomaliigi puhul on juba teada. Sellised kemikaalid peaksid esindama kemikaaliklasse, mille ainete puhul katsemeetodit eeldatavalt kasutatakse, ja samuti selliste ainete põhjustatava immuunvastuse kogu vahemikku, tugevast mõjust nõrga mõjuni ja mõju puudumiseni. Valideerimise eri staadiumide jaoks, samuti eri katsemeetodite ja kasutusalaade puhul võidakse nõuda võrdluskemikaalide eri kogumite kasutamist (9).

Asjakohasus: mõiste, millega väljendatakse seda, kas katsemeetod võimaldab uurida huvipakkuvat efekti, kas meetod on mõttekas ja sobib konkreetse eesmärgi jaoks. See näitab, millisel määral saab katsemeetodiga õigesti mõõta või ennustada huvipakkuvat bioloogilist efekti. Asjakohasus hõlmab ka katsemeetodi õigsuse (sisulise kooskõlalisuse) kaalutlusi (9).

Usaldusvärsus: mõiste, mis iseloomustab katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusvärsuse hindamiseks arvutatakse laborisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (9).

Asendav meetod: katsemeetod, mis on kavandatud tavakasutuses oleva kinnitatud meetodi asendamiseks ohtude kindlakstegemise ja/või riskide hindamise meetodina ning on määratud tagama kas inimeste või loomade tervise või keskkonna samaväärsuse või parema kaitse kui kinnitatud katsemeetod kõikide võimalike määramisolekordade ja uuritavate ainete puhul (9).

Tundlikkus: kõikide positiivsete / ärritava toimega kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkus näitab selgeid tulemusi andva katsemeetodi täpsust ja on oluline katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (9).

Nahaärritus: pöörduva nahakahjustuse tekkimine uuritava kemikaaliga kuni neljatunnise kokkupuute tagajärjel. Nahaärritus on kohalik mitteimmunogeenne reaktsioon, mis tekib lühikese aja jooksul pärast kokkupuudet (29). Selle põhitunnus on põletikureaktsiooni ja põletikuga seotud ärrituse enamiku iseloomulike kliiniliste tunnuste (punetus, turse, sügelus ja valu) pöördumus.

Spetsiifilisus: kõikide negatiivsete / ärritava toimeteta kemikaalide osakaal, mis katsemeetodi alusel klassifitseeritakse õigesti. Tundlikkus näitab selgeid tulemusi andva katsemeetodi täpsust ja on oluline katsemeetodi asjakohasuse hindamisel (9).

Astmelise katsetamise strateegia: katsetamine, milles katsemeetodit kasutatakse järjestatud viisil ja igal järgmisel tasandil valitakse katsemeetodid eelmisel katsetamistasandil saadud tulemuste alusel (9).

Uuritav kemikaal (ka „uuritav aine“): iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ M3

2. liide

Nahaärrituse määramiseks pakutava rekonstrueeritud inimepidermise mudelil (RhE) põhineva samalaadse või muudetud *in vitro* katsemetodi tulemuslikkusnõuded

SISSEJUHATUS

1. Tulemuslikkusnõuete eesmärk on esitada alus, mille põhjal uusi meetodeid, nii kaitstud (autoriõiguse või kaubamärgiga või registreeritud) meetodeid kui ka kaitsmata meetodeid, saaks tunnistada konkreetse uuringu jaoks piisava täpsuse ja usaldusväärsusega meetodiks. Selliseid valideeritud ja tunnustatud meetoditel põhinevaid tulemuslikkusnõudeid saab kasutada selleks, et hinnata muude analoogsete, samalaadsetele teaduslikele põhimõtetele tuginevate ja samade bioloogiliste või toksiliste mõjude mõõtmiseks või ennustamiseks kasutatavate, nn mina-kah-meetodite usaldusväärsust ja täpsust (9).

2. Enne muudetud meetodi, s.o kinnitatud meetodi võimaliku täiustatud variandi vastuvõtmist peaks toimuma hindamine, et teha kindlaks kavandatud muudatuste mõju katse tulemuslikkusele ja millisel määral sellised muudatused mõjutavad teavet muude valideerimisprotsessi osade kohta. Olenevalt pakutavate muudatuste arvust ja laadist, muudatuste kohta saadud andmetest ja muudatusi toetavatest dokumentidest tuleks nende suhtes kohaldada kas sama valideerimisprotsessi kui uue katsemetodi puhul või usaldusväärsuse ja asjakohasuse piiratud hindamist kehtestatud tulemuslikkusnõuete alusel (9).

3. Mõnega kolmest valideeritud meetodist (EpiSkin™ (*Validated Reference Method*) (valideeritud võrdlusmeetod), VRM), EpiDerm™ SIT (EPI-200) ja SkinEthic™ RHE) sarnanevat (mina-kah-) meetodit või muudetud meetodit, mis esitatakse kasutamiseks käesoleva katsemetodi alusel, tuleks hinnata, et määrata kindlaks sellise meetodi usaldusväärsus ja täpsus kõikide kemikaalide puhul, mis esindavad kogu Draize ärritavusskaalat. Kavandatud samalaadsel või muudetud katsemetodil peaksid kõigi 20 tulemuslikkusnõuete täitmise kontrollimiseks soovitatud võrdluskemikaaliga (tabel 1) hindamisel olema usaldusväärsuse ja täpsuse näitajad, mis oleksid võrreldavad valideeritud standardmeetodi näitajatega (tabel 2) või nendest paremad (2, 16). Usaldusväärsuse ja täpsuse väärtused, mis tuleks saavutada, on esitatud käesoleva liite punktides 8–12. Loetelu hõlmab klassifitseerimata (ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse kategooriata kemikaal) ja klassifitseeritud (ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse 2. kategooria kemikaal) kemikaale, mis esindavad eri kemikaaliklasse, et kavandatud katsemetodi usaldusväärsust ja tulemuslikkuse näitajaid (tundlikkus, spetsiifilisus, üldine täpsus) saaks võrrelda valideeritud katsemetodi asjaomaste väärtustega. Meetodi usaldusväärsust ja võimet õigesti kindlaks teha ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse 2. kategooria ärritavaid kemikaale ning regulatiivsest raamistikust olenevalt ka ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse kategooriata kemikaale tuleks kontrollida enne seda, kui meetodit kasutatakse uute uuritavate kemikaalide katsetamiseks.

4. Need tulemuslikkusnõuded põhinevad alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskuse (EC-ECVAM) tulemuslikkusnõuetel (8), mis on ajakohastatud vastavalt ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse klassifitseerimis- ja märgistamissüsteemidele (1, 3). Tulemuslikkusnõuded määrati esialgsel kujul kindlaks pärast valideerimisuringu (21) lõpuleviimist ja need põhinesid ELi klassifitseerimissüsteemil, mis on esitatud komisjoni 6. augusti 2001. aasta direktiivis 2001/59/EÜ, millega kahekümne kaheksandat korda kohandatakse tehnika arenguga nõukogu direktiivi 67/548/EMÜ ohtlike ainete liigitamist, pakendamist ja märgistamist käsitlevate õigus- ja haldusnormide ühtlustamise kohta⁽¹⁾. Seoses ÜRO klassifitseerimis- ja

⁽¹⁾ EÜT L 225, 21.8.2001, lk 1.

▼ **M3**

märgistamissüsteemi GHS kasutuselevõttuga ELis (ELi CLP-määrus) (3), mis toimus enne valideerimisuringu lõpuleviimist ja käesoleva katsemeetodi valmimist, on tulemuslikkusnõudeid ajakohastatud (8). Ajakohastamine hõlmab peamiselt i) muudatusi tulemuslikkusnõuete võrdluskemikaalide kogumis ning ii) kindlaksmääratud usaldusväärsus- ja täpsusnõudeid (2, 23).

NAHAÄRRITUSE RHE ABIL *IN VITRO* MÕÕTMISE KATSEMEETODITE TULEMUSLIKKUSNÄITAJAD

5. Tulemuslikkusnäitajad hõlmavad järgmist kolme aspekti (9):

I. katsemeetodi olulised koostisosad,

II. võrdluskemikaalide miinimumloetelu,

III. usaldusväärsuse ja täpsuse kindlaksmääratud väärtused.

I. Katsemeetodi olulised koostisosad

6. Need hõlmavad valideeritud meetodi olulisi struktuurilisi, põhimõttelisi ja teostuslikke osi, mis peaksid olema ka kavandatud, teostuslikult ja põhimõtteliselt samalaadse või muudetud meetodi katse-eeskirjas. Sellised osad hõlmavad meetodi eriomadusi, üliolulisi teostuslikke üksikasju ja kvaliteedikontrolli meetmeid. Katsemeetodi oluliste osade säilitamine aitab tõendada, et kavandatud samalaadne või muudetud meetod toetub samadele aluspõhimõtetele kui vastav valideeritud võrdlusmeetod (9). Katsemeetodi olulised osad on üksikasjalikult kirjeldatud punktides katsemeetodi 16–21 ja katsetamine peaks toimuma järgmises korras:

— üldtingimused (punkt 16);

— funktsionaalsed tingimused, mis hõlmavad järgmist:

— eluvõimelisus (punkt 17);

— toimimine kaitsekihina (punkt 18);

— morfoloogia (punkt 19);

— reprodutseeritavus (punkt 20) ning

— kvaliteedikontroll (punkt 21).

II. Võrdluskemikaalide miinimumloetelu

7. Võrdluskemikaale kasutatakse selleks, et teha kindlaks, kas uus või muudetud meetod, mis nii ülesehituse kui ka põhimõtte poolest on tõendatult piisavalt sarnane valideeritud võrdlusmeetodiga või on kolmest valideeritud meetodist ühe väike modifikatsioon, annab usaldusväärsuse ja täpsuse poolest valideeritud võrdlusmeetodi tulemustega võrreldavaid või paremaid tulemusi (2, 8, 16, 23). Tabelis 1 soovitatud 20 võrdluskemikaali hõlmavad eri kemikaaliklassidesse (st funktsionaalrühmale vastavatesse kemikaalikategooriatesse) kuuluvaid kemikaale ja esindavad kogu Draize ärritavusskaalat (mitteärritavatest ainetest kuni tugevat ärritust põhjustavate aineteni). Loetelu ainetest kümme kuuluvad ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse 2. kategooria kemikaalide hulka ja kümme on kategooriata kemikaalid, millest kolm on ÜRO GHS-süsteemi 3. valikkategooria kemikaalid. Käesoleva katsemeetodi kohaselt käsitatakse 3. valikkategooriat kategooria puudumisena. Tabelis 1 loetletud kemikaalid on valitud eelvalideerimisele järgnenud optimeerimisetalil ja võrdlusmeetodi valideerimisel kasutatud kemikaalide hulgast, arvestades keemilisi

▼ M3

funktsionaalrühmi ja füüsikalist olekut (14, 18). Võrdluskemikaalid on vähimalt nõutav arv kemikaale, mida tuleks kasutada selleks, et hinnata esitatud samalaadse või muudetud meetodi täpsust ja usaldusväärsust, kuid neid ei tuleks kasutada uute meetodite väljatöötamiseks. Kui mõnda loetletud ainet ei ole saada, võib kasutada muid kemikaale, mille kohta *in vivo* katsega on määratud piisavad võrdlusandmed, eelkõige kemikaale eelvalideerimisele järgnenud optimeerimisetapil või võrdlusmeetodi valideerimisel kasutatud kemikaalide hulgast. Soovi korral võib võrdluskemikaalidele miinimumloendisse lisada kavandatud katsemeetodi täpsuse hindamiseks muid kemikaale, mis esindavad muid kemikaalklasse ja mille kohta on *in vivo* katsega määratud piisavad võrdlusandmed.

Tabel 1

Võrdluskemikaalide miinimumloetelu nahaärrituse määramise RhE-põhise samalaadse või muudetud katsemeetodi täpsuse ja usaldusväärsuse määramiseks (1)

Kemikaal	CASi number	Füüsikaline olek	Hinne <i>in vivo</i>	Valideeritud võrdlusmeetodiga <i>in vitro</i> määratud kategooria	ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse kohane <i>in vivo</i> kategooria
1-bromo-4-klorobutaan	6940-78-9	vedelik	0	2. kat.	kat-ta
dietüülftaal	84-66-2	vedelik	0	kat-ta	kat-ta
naftüüläädikhape	86-87-3	tahke	0	kat-ta	kat-ta
allüülfenoksüatsetaat	7493-74-5	vedelik	0,3	kat-ta	kat-ta
isopropanool	67-63-0	vedelik	0,3	kat-ta	kat-ta
4-metüülitiobensaldehüüd	3446-89-7	vedelik	1	2. kat.	kat-ta
metüülstearaat	112-61-8	tahke	1	kat-ta	kat-ta
heptüülbutüraat	5870-93-9	vedelik	1,7	kat-ta	kat-ta
heksüülsaltsülaat	6259-76-3	vedelik	2	kat-ta	kat-ta
kaneelaldehüüd	104-55-2	vedelik	2	2. kat.	kat-ta (vabatahtlikult kohald. kat. 3) (3)
1-dekanool (2)	112-30-1	vedelik	2,3	2. kat.	2. kat.
3-p-kumenüül-2-metüülpropionaaldehüüd	103-95-7	vedelik	2,3	2. kat.	2. kat.
1-bromoheksaan	111-25-1	vedelik	2,7	2. kat.	2. kat.
2-klorometüül-3,5-dimetüül-4-metoksüpüridiinvesinikkloriid	86604-75-3	tahke	2,7	2. kat.	2. kat.
di-n-propüüldisulfiid (2)	629-19-6	vedelik	3	kat-ta	2. kat.
kaaliumhüdroksiid (5 % vesilahus)	1310-58-3	vedelik	3	2. kat.	2. kat.
5-(1,1-dimetüületüül)-2-metüülbenseentiool	7340-90-1	vedelik	3,3	2. kat.	2. kat.
1-metüül-3-fenüül-1-piperasiin	5271-27-2	tahke	3,3	2. kat.	2. kat.

▼M3

Kemikaal	CASi number	Füüsikaline olek	Hinne <i>in vivo</i>	Valideeritud võrdlusmeetodiga <i>in vitro</i> määratud kategooria	ÜRO GHS-süsteemi ja ELi CLP-määruse kohane <i>in vivo</i> kategooria
heptanaal	111-71-7	vedelik	3,4	2. kat.	2. kat.
tetrakloroetüleen	127-18-4	vedelik	4	2. kat.	2. kat.

- (1) Kemikaalid on valitud järgmiste kriteeriumide põhjal: i) kemikaalid on müügil; ii) kemikaalid esindavad kogu Draize ärritavusskaalat (mitteärritavatest ainetest kuni tugevat ärritust põhjustavate aineteni); iii) nende kõigi keemiline ehitus on hästi teada; iv) nad esindavad samade funktsionaalrühmadega kemikaaliklasse, mida kasutati valideerimisel, ning v) nad ei ole äärmiselt mürgised (näiteks kantserogeensed või viljakust kahjustavad) ja nende kõrvaldamine ei ole seotud ülemääraste kuludega.
- (2) Kemikaalid, mis on ärritavad küüliku jaoks, kuid mille kohta on usaldusväärsed tõendid, et nad ei ole ärritavad inimese jaoks (31, 32, 33).
- (3) ÜRO GHS-süsteemi, kuid mitte ELi CLP-määruse kohaselt.

III. Usaldusväarsuse ja täpsuse kindlaksmääratud väärtused

8. Kui kavandatud samalaadne või muudetud meetod antakse üle muudele laboritele, tuleb selle usaldusväarsuse ja asjakohasuse tõendamiseks määrata kõik tabelis 1 loetletud 20 kemikaali vähemalt kolmes laboris. Kuid kui kavandatud meetodit hakatakse kasutama üksnes ühes laboris, siis valideerimiseks ei nõuta selle kontrollimist paljudes laborites. Oluline on siiski, et selliseid valideerimisuuringuid hindaksid sõltumatult vastavalt rahvusvahelistele suunistele (9) rahvusvaheliselt tunnustatud valideerimisasutused. Igas laboris tuleks kõiki 20 võrdluskemikaali uurida kolme sõltumatu katsega, mis tehakse eri koepartiidega ja piisavalt pikkade ajavahemike järel. Iga katse peaks koosnema vähemalt kolmest paralleelselt tehtavast paralleelproovist iga uuritava kemikaaliga, negatiivsest kontrollist ja positiivsest kontrollist.
9. Kavandatud meetodi usaldusväarsuse ja täpsuse väärtuste arvutused tuleks teha, arvestades korraga kõiki järgmisi kriteeriume ja tagades, et usaldusväarsuse ja asjakohasuse väärtused arvutatakse varem kindlaks määratud ja kooskõlalisel viisil:
- laborisisese ja laboritevahelise varieeruvuse ning ennustamisvõime (täpsuse) arutamiseks kõlbavad üksnes andmed, mis on saadud täielikest katseseeriast;
 - iga võrdluskemikaali lõplik klassifitseerimine igas osalevas laboris peaks põhinema erinevates täielikes katseseeriates määratud eluvõimelisuse keskvaartusel;
 - laboritevahelise varieeruvuse arutamiseks kõlbavad üksnes sellised katseandmed, mis on kemikaali kohta saadud kõikides laborites täielikes katseseeriates;
 - täpsuse väärtuste arvutus tuleks teha üksikute laborite ennustuste põhjal, mis on saadud kõigi 20 võrdluskemikaali jaoks kõigis osalevates laborites.

Katseseeria all mõistetakse siin ühes laboris ühe uuritava kemikaaliga tehtud kolme sõltumatut katset. **Täielik katseseeria** on ühes laboris ühe uuritava kemikaaliga tehtud katseseeria, mille kõik kolm katset on kehtivad. See tähendab, et üksainus vigaseks tunnistatud katse muudab kehtetuks terve kolmest katsest koosneva katseseeria.

Laborisisene reprodutseeritavus

10. Laborisisese korratavuse hinnang peaks näitama, et klassifitseerimistulemused (ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse kohane 2. kategooria või ilma kategooriata kemikaal), mis on saadud eraldi sõltumatutel määramistel 20 võrdluskemikaaliga ühes laboris, on omavahel kooskõlas vähemalt (≥) 90 % juhtudest.

▼ M3

Laboritevaheline reprodutseeritavus

11. Laboritevahelise reprodutseeritavuse hindamine ei ole oluline, kui kavandatud meetodit kavatakse kasutada ühesainsas laboris. Kui meetodit tahetakse edasi anda teistesse laboritesse, peaks laboritevahelise varieeruvuse hinnang näitama, et klassifitseerimistulemused (ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse kohane 2. kategooria või ilma kategooriata kemikaal), mis on saadud eraldi sõltumatutel määramistel 20 võrdluskemikaaliga eelistatavalt vähemalt kolmes laboris, on omavahel kooskõlas vähemalt (\geq) 80 % juhtudest.

Ennustusvõime (täpsus)

12. Kavandatud samalaadse või muudetud meetodi täpsus (tundlikkus, spetsiifilisus ja üldine täpsus) peaks olema võrreldav valideeritud võrdlusmeetodi omaga või sellest parem, arvestades lisateavet asjakohasuse kohta huvipakkuva liigi puhul (tabel 2). Tundlikkus peaks olema vähemalt 80 % (2, 8, 23). Kavandatud *in vitro* meetodi puhul kohaldatakse ka veel konkreetset lisapiirangut: nimelt on ainult kahte *in vivo* katse järgi 2. kategooria kemikaali – *1-dekanooli* ja *di-n-propüüldisulfiidi* – lubatud ekslikult klassifitseerida kategooriata kemikaaliks rohkem kui ühel osaleval laboril. Spetsiifilisus peaks olema vähemalt 70 % (2, 8, 23). Kavandatud *in vitro* meetodi spetsiifilisusega seotud piiranguid rohkem ei ole, st iga osalev labor võib valesi klassifitseerida mis tahes kemikaali, mis *in vivo* katse järgi on kategooriata, kui katsemetodi lõplik spetsiifilisus on nõutavas vahemikus. Üldine täpsus peaks olema vähemalt 75 % (2, 8, 23). Kuigi valideeritud võrdlusmeetodi tundlikkus tabelis 1 esitatud 20 võrdluskemikaaliga on 90 %, nõutakse samalaadselt või muudetud meetodilt valideeritaks pidamiseks minimaalselt tundlikkust 80 %, kuna nii *1-dekanool* (piiripealne kemikaal) kui ka *di-n-propüüldisulfiid* (valideeritud võrdlusmeetodi puhul valenegatiiv) ei ole inimese jaoks ärritavad kemikaalid (31, 32, 33), kuigi küülikuga leitakse neil ärritav toime. Kuna RhE-mudelid põhinevad inimpäritoluga rakkudel, võidakse nende mudelitega saada tulemus, et need ei ärrita (ÜRO GHS-süsteemi / ELi CLP-määruse järgi kategooriata).

Tabel 2

Samalaadse või muudetud meetodi valideeritaks tunnistamiseks nõutavad tundlikkuse, spetsiifilisuse ja üldise täpsuse ennustusväärtused

Tundlikkus	Spetsiifilisus	Üldine täpsus
≥ 80 %	≥ 70 %	≥ 75 %

Uuringu nõuetekohasuse kriteeriumid

13. On võimalik, et üks või mitu katset ühe või mitme võrdluskemikaaliga ei vasta katse ja kontrollkemikaalide nõuetekohasuse tingimustele või ei vasta nõuetele muul põhjusel. Puuduvate andmete täiendamiseks on iga uuritava kemikaaliga lubatud teha kuni kaks lisakatset („ülemõõtmine”). Täpsemalt, kuna ülemõõtmise puhul tuleb paralleelselt teha ka positiivse ja negatiivse kontrolli katsed, lubatakse iga uuritava kemikaaliga teha kuni kaks lisakatset.
14. On mõeldav, et isegi pärast ülemõõtmist ei saada igas osalevas laboris iga võrdluskemikaali kohta kokku nõutavat kolme kehtivat katset; nii saadakse ebatäielik andmete tabel. Sellisel juhul peavad olema täidetud kõik järgmised kolm kriteeriumi, et andmekogumeid võiks siiski pidada nõuetele vastavaks:

1. iga võrdluskemikaali kohta 20st peab olema vähemalt üks täielik katseeria;

▼ **M3**

2. igas laboris vähemalt kolmest osalevast laborist peavad vähemalt 85 % katseseeriast olema täielikud katseseeriad (20 kemikaaliga; st ühes laboris on lubatud kuni kolm nõuetele mittevastavat katseseeriat);
3. vähemalt 90 % kõigist võimalikest katseseeriast vähemalt kolmes osalevas laboris peavad olema täielikud (20 kemikaaliga kolmes laboris; st kokku on lubatud kuni 6 nõuetele mittevastavat katseseeriat).

▼ **M2****B. 47. VEISE SARVKESTA HÄGUSUSE JA LÄBILASKVUSE KATSEMEETOD SILMA SÖÖVITAVATE JA TUGEVASTI ÄRRITAVATE AINETE KINDLAKSTEGEMISEKS**

SISSEJUHATUS

1. Veise sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse katse (*Bovine Corneal Opacity and Permeability* – BCOP) on *in vitro*-katsemeetod, mida võib teatavatel asjaoludel ja teatavate piirangutega kasutada, et klassifitseerida aineid ja segusid silma söövitavaks ja tugevasti ärritavaks (1), (2), (3). Käesoleva katsemeetodi puhul määratletakse tugevasti ärritava toimega aineks või seguks sellised, mis tekitavad küülikul pärast pealekandmist vähemalt 21 päeva püsiva silmakahjustuse. Katsemeetodit ei peeta küüliku silma *in vivo*-katse täieliku asendamise jaoks kõlblikuks; BCOP-meetodit soovitatakse kasutada astmelise katsetamise strateegia osana õigusliku klassifitseerimise ja märgistamise jaoks konkreetses kasutusvaldkonnas (4), (5). Uuritavad ained ja segud (6) võib klassifitseerida silma söövitavaks või tugevasti ärritavaks aineks ilma edasise katsetamiseta küülikutel. Negatiivse tulemuse andnud ainet on vaja katsetada küülikul, kasutades järjekordsete katsete strateegiat, mis on esitatud OECD katsesuunises 405 (7) (käesoleva lisa B.5 peatükk).
2. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on kirjeldada menetlusi, mida kasutatakse uuritava aine silma söövitava või tugevasti ärritava toime hindamiseks, tuginedes aine omadusele põhjustada veise isoleeritud sarvkestale hägustumist ja suurendada selle läbilaskvust. Toksilist mõju sarvkestale mõõdetakse: i) valguse läbilaskvuse vähenemise (hägususe tekke) ja ii) naatriumfluoresteiini läbilaskvuse suurenemise järgi. Uuritava aine klassifitseerimiseks silma ärritava toime järgi kasutatakse nn *in vitro*-ärritavuse hinnet (In Vitro Irritancy Score, IVIS), mille arvutamiseks kombineeritakse pärast uuritava ainega kokkupuudet toimunud sarvkesta hägustumise ja läbilaskvuse suurenemise hinnangud.
3. BCOP-meetodiga on uuritud ka silmärritajaid, mille tekitatud kahjustused paranevad vähem kui 21 päevaga, samuti aineid, mis silmi ei ärrita. Kuid sellistesse kategooriatesse kuuluvate ainete puhul ei ole BCOP-meetodi täpsust ja usaldusväärsust ametlikult hinnatud.
4. Mõisted on esitatud 1. liites.

ALGSED KAALUTLUSED JA PIIRANGUD

5. Käesolev katsemeetod põhineb alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) BCOP-meetodi eeskirjal (8), mis töötati välja rahvusvahelise valideerimisuuringu alusel (4), (5), (9), millesse andsid oma panuse alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskus (ECVAM) ja alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskus (JaCVAM). Eeskiri põhineb *In Vitro* Teaduste Instituudis (IIVS) saadud teabel ja INVITTOXi eeskirjal 124 (10), mida kasutati Euroopa Ühenduse rahastatud BCOP-meetodi eelvalideerimisuuringus 1997–1998. Mõlemad eeskirjad põhinevad BCOP-katse eeskirjal, mille esimesena avaldasid Gautheron ja kaasautorid (11).

▼ M2

6. Käesoleva katsemeetodi puhul kindlaks tehtud piirangud on seotud valepositiivsete tulemuste kõrge osakaaluga alkoholide ja ketoonide puhul ning valenegatiivsete tulemuste kõrge osakaaluga tahkete ainete puhul, mida täheldati valideerimisandmebaasi puhul (vt punkt 44) (5). Kui osutatud kemikaaliklassidesse ja füüsikalistesse aineklassidesse kuuluvad ained andmebaasist välja jätta, suureneb BCOP-meetodi täpsus ELi ja USA keskkonnaameti (EPA) klassifitseerimissüsteemi ning ka ülemaailmselt ühtlustatud klassifitseerimissüsteemi (GHS) järgi oluliselt (5). Pidades silmas kõnealuse katse eesmärki (teha üksnes kindlaks silmi söövitavad või tugevasti ärritavad ained), ei ole valenegatiivsed tulemused väga olulised, kuna selliseid aineid uuritakse reguleerivate asutuste nõuetest olenevalt edasi küülikutel või muudes korralikult valideeritud *in vitro*-katsetes, kasutades järjestikuste katsete strateegiat ja tõendite kaalukuse lähenemisviisi. Lisaks ei võimaldanud senine valideerimisandmebaas õigesti hinnata mõnesid kemikaali- või tooteklasse (näiteks segusid). Kuid teadlased võiksid kaaluda kõnealuse meetodi kasutamist kõigi uuritava materjali tüüpide, kaasa arvatud segude puhul, kusjuures positiivse tulemuse võiks lugeda tõendiks, et tegemist on silma söövitava või tugevasti ärritava toimega. Alkoholide ja ketoonidega saadud positiivseid tulemusi tuleks võtta ettevaatusega, kuna nende puhul on oht mõju ülehinnata.
7. Veiste silmade ja sarvkestadega tehtavate toimingute puhul tuleks alati järgida katselaboris kohaldatavaid loomadelt saadud materjalide, kaasa arvatud kudede ja koevedelike jne käsitlemise eeskirju ja korda. Soovitatakse kasutada üldisi laborite ettevaatusmeetmeid (12).
8. Katsemeetodi kasutatavust piirab asjaolu, et kuigi selle puhul võetakse arvesse mõnesid silmaga seotud mõjusid, mida on hinnatud küüliku silma ärritavuse katses, ja mingil määral ka mõjude tugevust, ei peegelda katse silma sidekesta ja vikerkesta kahjustusi. Kuigi BCOP-katsega ei saa põhimõtteliselt hinnata sarvkestakahjustuste pöördumust, on küüliku silma uuringute alusel soovitatud kasutada sarvkestakahjustuse esialgset sügavust pöördumatu ja pöörduva mõju eristamiseks (13). Lõpuks ei võimalda BCOP-katse hinnata ainete silmasattumisega kaasneva süsteemse toksilisuse võimalust.
9. Jätkatakse uuringuid BCOP-katse kasulikkuse ja piirangute edasiseks iseloomustamiseks ainete puhul, millel ei ole silma tugevasti ärritavat või ärritavat toimet (vt ka punkt 45). Meetodi kasutajatel palutakse valideerimisorganisatsioonidele saata näidiseid ja/või andmeid, et ametlikult hinnata BCOP-katse võimalikku muud tulevast kasutust, sealhulgas ka ainete puhul, millel ei ole silma tugevasti ärritavat või ärritavat toimet.
10. Iga labor, kes alustab katsemeetodi kasutamist, peaks oma taseme kontrollimiseks kasutama 2. liites esitatud kemikaale. Labor võib osutatud kemikaale kasutada selleks, et tõendada oma tehnilist pädevust BCOP-katse läbiviimisel, enne kui ta esitab BCOP-katsega saadud andmed regulatiivseks ohu klassifitseerimiseks.

KATSE PÕHIMÕTE

11. BCOP-meetod on organotüüpne mudel, mille abil on lühiajaliselt võimalik *in vitro* säilitada veise sarvkesta normaalseid füsioloogilisi ja biokeemilisi funktsioone. Katsemeetodis hinnatakse uuritava aine põhjustatud kahjustust sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse muutuste mõõtmisega hägususe mõõtja ja nähtava valguse spektromeetri abil. Nende kahe mõõdetud suuruse järgi arvutatakse IVIS, mille alusel uuritavale ainele omistatakse *in vitro* määratud ärritavuse klassifikatsioonikategooria, et ennustada aine võimet ärritada silma *in vivo* (vt otsustamise kriteeriumid).

▼ **M2**

12. BCOP-meetodi puhul kasutatakse värskest tapetud veise silmast eraldatud sarvkesta. Sarvkesta hägusust mõõdetakse sarvkesta läbinud valgushulga mõõtmisega. Läbilaskvuse mõõtmiseks mõõdetakse värvaine naatriumfluorestseini kogus, mis on läbinud kogu sarvkesta paksuse ja jõudnud sarvkestataguses kambris olevasse lahusesse. Uuritavad ained kantakse sarvkesta epiteliaalsele pinnale sel teel, et need lisatakse sarvkestahoidja eespoolsesse kambrisse. 3. liites on esitatud BCOP-katses kasutatava sarvkestahoidja kirjeldus ja skeem. Sarvkestahoidjaid võib osta mitmelt firmalt või ehitada ise.

Veisesilmade hankimise allikad, kasutatavate loomade vanus ja valimine

13. Tapamajja saadetavad loomad tapetakse harilikult kas inimtoiduks või muul kaubanduslikul eesmärgil. BCOP-katseks sobib üksnes sarvkest, mis on võetud tervelt loomalt, keda peetakse sobivaks inimtoidus kasutamiseks. Kuna tapetavad loomad on tõust, vanusest ja soost olenevalt väga erineva kaaluga, ei ole looma soovitatavat kaalu tapmise ajal määratletud.

14. Eri vanuses loomade silmade kasutamise korral võivad sarvkesta mõõtmed olla erinevad. Sarvkestad, mille horisontaalläbimõõt on üle 30,5 mm ja paksus keskosas vähemalt 1 100 µm, saadakse tavaliselt üle kaheksa aasta vanustelt loomadelt, samas kui sarvkestad horisontaalläbimõõduga alla 28,5 mm ja paksusega keskosas alla 900 µm saadakse tavaliselt loomadelt, kelle vanus on alla viie aasta (14). Seepärast kasutatakse tavaliselt silmi, mis on saadud kuni 60 kuu vanustelt loomadelt. Alla 12 kuu vanuste loomade silmi ei ole tavaliselt kasutatud, kuna selliste loomade silmad alles arenevad ning sarvkesta paksus ja läbimõõt on oluliselt väiksemad kui täiskasvanud loomade silmades. Noorte loomade (vanus 6–12 kuud) sarvkestade kasutamine on siiski lubatav, kuna neil on ka eeliseid, nagu parem kättesaadavus, kitsas vanusevahemik ja väiksem oht, et töötajad võivad kokku puutuda veiste spongiformse entsefalopaatiaga (15). Kuna oleks kasulik hinnata söövitavate või ärritavate ühendite suhtes avalduva sarvkesta tundlikkuse sõltuvust sarvkesta suurusest või paksusest, palutakse kasutajatel teatada, millises vanuses või millise kaaluga loomadelt pärinesid uuringus kasutatud sarvkestad.

Silmade kogumine ja toimetamine laborisse

15. Silmad kogutakse tapamaja töötajate poolt. Mehaaniliste ja muude kahjustuste miinimumini viimiseks tuleks silmad silmakoopast eemaldada võimalikult kiiresti pärast looma surma. Et vältida silmade kokkupuudet ärritust põhjustavate ainetega, ei tohiks tapamaja töötajad looma pea loputamisel kasutada detergente.

16. Silmad tuleks paigutada sobiva suurusega anumasse nii, et need oleksid üleni kaetud Hanksi tasakaalustatud soolalahusega (*Hanks' Balanced Salt Solution*, HBSS), ja toimetada laborisse viisil, mille puhul nende kahjustuse või bakteriaalse saastuse oht oleks minimaalne. Kuna silmi kogutakse tapmisprotsessi ajal, võivad need kokku puutuda vere ja muude bioloogiliste ainetega, sealhulgas bakterite ja muude mikroorganismidega. Seepärast on oluline viia saastuse oht miinimumini (näiteks silmi sisaldava anuma hoidmisega jää peal ning silmade säilitamiseks ja transportimiseks kasutatavale Hanksi lahusele antibiootikumide lisamisega (näiteks 100 RÜ/ml penitsilliini ja 100 mg/ml streptomütsiini)).

▼ **M2**

17. Ajavahemik silmade kogumise ja sarvkestade BCOP-katses kasutamise vahel peaks olema võimalikult lühike (tavaliselt kogutakse ja kasutatakse samal päeval), kusjuures tuleks tõendada, et katsetulemused ei sõltu konkreetsest ajavahemikust. Tulemuste aluseks on silmade valimise kriteeriumid ning positiivse ja negatiivse kontrolli katsetes saadud tulemused. Kõik katses kasutatud silmad peavad pärinema ühest ja samast silmade rühmast, mis on kogutud ühel konkreetsel päeval.

BCOP-katses kasutatavate silmade valimise kriteeriumid

18. Silmi kontrollitakse peale laborisse saabumist hoolikalt, et neil ei esineks defekte, sealhulgas suurenenud hägusust, kriimustusi ja neovaskularisatsiooni. Kasutatakse ainult sellistest silmadest pärit sarvkesti, milles osutatud defekte ei ole.
19. Iga sarvkesta kvaliteeti hinnatakse ka katse hilisematel etappidel. Katses ei kasutata sarvkesti, mille hägusust pärast esialgset ühetunnilist tasakaalustumist on üle 7 hägususühiku (märkus: hägusumõõtja kaliibritakse hägusustandarditega, mida kasutatakse hägususühikute määramiseks, vt 3. liide).
20. Igas katserühmas (uuritav aine, sellega paralleelselt läbiviidavad positiivse ja negatiivse kontrolli katsed) kasutatakse vähemalt kolme silma. BCOP-katses kasutatakse negatiivse kontrolli katses kolme sarvkesta. Kuna kõik sarvkestad eemaldatakse tervelt silmamunalt ja paigutatakse sarvkestakambrisse, võivad üksiku sarvkesta, sealhulgas negatiivse kontrolli katses kasutatud sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse väärtusi mõjutada käsitsemisest tekkinud artefaktid. Lisaks kasutatakse negatiivse kontrolli katses saadud hägususe ja läbilaskvuse väärtusi *in vitro*-ärritavuse hinnet (IVIS) arvutamisel uuritava ainega ja positiivse kontrolli katsetes saadud vastavate väärtuste parandamiseks.

KATSE KÄIK**Silmade ettevalmistamine**

21. Defektidest vabad sarvkestad lõigatakse välja koos 2–3 mm laiuse kõvakestaäärega, mis hõlbustab edasist käsitsemist, kusjuures tuleb vältida sarvkesta epiteeli ja endoteeli kahjustamist. Isoleeritud sarvkest kinnitatakse spetsiaalsesse sarvkestahoidjasse, millel on eespoolne kamber – selle poole on sarvkesta epiteelialne külg –, ja tagapoolne kamber, mille poole on endoteelialne külg. Mõlemad kambrid täidetakse kuni ülevoolamiseni eelsoojendatud EMEM-lahusega (*Eagle's Minimum Essential Medium*), alustades tagapoolsest kambrist ja hoolitsedes, et kambris ei tekiks mulle. Seadet tasakaalustatakse seejärel temperatuuril 32 ± 1 °C vähemalt üks tund, et sarvkest saavutaks tasakaalu ümbritseva keskkonnaga ja saavutaks normaalse metaboolse aktiivsuse (sarvkesta pinna ligikaudne temperatuur *in vivo* on 32 °C).
22. Pärast tasakaalustumisperioodi lisatakse mõlemasse kambrisse värsket eelsoojendatud EMEM-lahust ja registreeritakse iga sarvkesta hägususe nullväärtus. Sarvkestad, millel on makroskoopilisi koekahjustusi (näiteks kriimustused, pigmentatsioon, neovaskularisatsioon) või mille hägusust on suurem kui 7 hägususühikut, jäetakse kõrvale. Arvutatakse kõigi tasakaalustatud sarvkestade keskmine hägusust. Negatiivse (või lahusti-) kontrolli katseteks valitakse vähemalt kolm sarvkesta, mille hägususe väärtused on kõigi sarvkestade hägususe keskvaertuse lähedal. Ülejäänud sarvkestad jagatakse seejärel kahte rühma: uuritava ainega töödeldavad ja positiivse kontrolli katse sarvkestad.

▼ M2

23. Kuna vee soojusmahtuvus on suurem kui õhul, on inkubeerimise ajal võimalik veega saavutada püsivamaid temperatuuritingimusi. Seepärast soovitatakse täidetud sarvkestahoidjate termostateerimiseks temperatuuril 32 ± 1 °C kasutada vesivanni. Kuid kasutada võib ka õhktermostaate, võttes vajalikud meetmed temperatuuri stabiilsuse tagamiseks (näiteks hoidjate ja lahuste eelsoojendamine).

Uuritava aine pealekandmine

24. Kasutatakse kaht pealekandmismeetodit, millest üks on vedelike ja (tahkete või vedelate) pindaktiivsete ainete jaoks ning teine on selliste tahkete ainete jaoks, millel ei ole pindaktiivseid omadusi.
25. Vedelikke katsetatakse lahjendamata kujul ning pindaktiivseid aineid katsetatakse kontsentratsioonis 10 massiprotsenti 0,9 % naatriumkloriidi lahuses, destilleeritud vees või muus lahustis, mille kohta on tõendatud, et see ei avalda kahjustavat mõju katsesüsteemile. Püdelaid aineid, kreeme ja vahasid uuritakse tavaliselt nagu vedelikke. Muu lahjenduskontsentratsiooni kasutamist tuleb veenvalt põhjendada. Sarvkestal lastakse vedelike ja pindaktiivsete ainetega kokku puutuda 10 minutit. Muu kokkupuuteaja kasutamise korral tuleb esitada veenev teaduslik põhjendus.
26. Tahkeid aineid, millel ei ole pindaktiivseid omadusi, katsetatakse lahuse või suspensioonina kontsentratsioonis 20 massiprotsenti 0,9 % naatriumkloriidi lahuses, destilleeritud vees või muus lahustis, mille kohta on tõendatud, et see ei avalda kahjustavat mõju katsesüsteemile. Teatavatel puhkudel ja veenva teadusliku põhjendusega võib tahkeid aineid katsetada ka puhtal kujul, kus uuritav aine kantakse otse sarvkesta pinnale, kasutades lahtise kambri meetodit (vt punkt 29). Sarvkest jäetakse tahke ainega kokkupuutesse neljaks tunniks, kuid nagu vedelike ja pindaktiivsete ainete puhulgi võib veenva teadusliku põhjendusega kasutada ka muid kokkupuuteaegu.
27. Pealekandmiseks võib kasutada mitmesuguseid meetodeid, olenevalt uuritava aine füüsikalisest olekust ja keemilistest omadustest (näiteks tahke aine, vedelik, viskoosne või mitteviskoosne vedelik). Oluline on tagada, et uuritav aine korralikult kataks epiteliaalse pinna ja täielikult eemaldataks loputamistega. Mitteviskoosse või väheviskoosse uuritava vedeliku puhul kasutatakse tavaliselt suletud kambri meetodit; poolviskoosse ja viskoosse vedeliku või tahke puhta aine uurimiseks kasutatakse tavaliselt lahtise kambri meetodit.
28. Suletud kambri meetodi kasutamise korral viiakse eespoolsesse kambrisse kambri ülaosas asuvate pealekandmisavade kaudu piisav kogus uuritavat ainet (750 µl), et see kataks sarvkesta epiteliaalse külje; seejärel avad suletakse kokkupuuteajaks korkidega. Oluline on tagada, et iga sarvkest oleks uuritava ainega kokkupuutes vajaliku ajavahemiku jooksul.
29. Lahtise kambri meetodi kasutamisel võetakse eespoelse kambri akent hoidev rõngas ja klaasaken enne pealekandmist ära. Kontrollaine või uuritav aine (750 µl või sarvkesta täielikuks katmiseks piisav kogus) kantakse mikropipetiga otse sarvkesta epiteliaalsele pinnale. Kui uuritavat ainet on raske pipeteerida, võib pealekandmise hõlbustamiseks viia uuritava aine surve all kolbpipetti. Kolbpipeti otsik viiakse tihedalt süstla dosaatorotsikusse, nii et ainet saab rõhu all viia kolbpipeti otsikusse. Samaaegselt pipetikolvi tagasitõmbamisega lastakse süstla kolb vabaks. Kui pipetiotsikusse ilmuvad õhumullid, surutakse uuritav aine välja ja võtet korratakse, kuni otsik on täidetud ja selles ei ole õhumulle. Vajaduse korral võib kasutada tavalist (ilma nõelata) süstalt, kuna sellega saab uuritava aine ruumala täpselt mõõta, samuti on sellega võimalik ainet hõlpsamini kanda sarvkesta epiteliaalsele pinnale. Pärast uuritava aine pealekandmist pannakse eespoelse kambri klaasaken tagasi, et taas tekiks suletud süsteem.

▼ **M2****Kokkupuutejärgne inkubeerimine**

30. Pärast kokkupuuteaja lõppu eemaldatakse uuritav aine, negatiivse kontrolli või positiivse kontrolli aine eespoolsest kambri ja epiteeli pestakse vähemalt kolm korda (või nii kaua, kuni aine jääke ei ole enam võimalik näha) EMEM-lahusega (millesse on lisatud fenoolpunast). Loputamiseks kasutatakse fenoolpunast sisaldavat lahust, kuna fenoolpunase värvusemuutust võib kasutada happeliste või aluseliste materjalide väljapesemise täielikkuse hindamiseks. Sarvkesti pestakse rohkem kui kolm korda, kui fenoolpunane muudab veel oma värvi (kollane või punakasilla) või kuni uuritavat ainet on veel näha. Kui keskkond on uuritavast ainest puhas, loputatakse sarvkesti viimast korda (fenoolpunast mittesisaldava) EMEM-lahusega. Fenoolpunast mittesisaldavat EMEM-lahust kasutatakse viimaseks loputuseks, et kindlustada fenoolpunase eemaldamine eespoolsest kambri enne hägususe mõõtmist. Seejärel täidetakse eespoolne kamber värsket (fenoolpunast mittesisaldavat) EMEM-lahusega.
31. Vedelike ja pindaktiivsete ainete puhul inkubeeritakse sarvkesti pärast loputamist veel kaks tundi temperatuuril 32 ± 1 °C. Mõnes olukorras on pikem ajavahemik pärast kokkupuudet kasulik ja seda tuleks iga kord kaaluda. Tahke ainega töödeldud sarvkesti loputatakse põhjalikult pärast neljatunnist kokkupuuteaega, kuid täiendavat inkubeerimist ei ole nende puhul vaja.
32. Vedeliku ja pindaktiivse aine puhul kokkupuutejärgse inkubatsiooniaja lõpus ning tahke, pindaktiivsete omadusteta aine puhul neljatunnise kokkupuuteaja lõpus registreeritakse iga sarvkesta hägusus ja läbilaskvus. Samuti vaadeldakse iga sarvkesta visuaalselt ja märgitakse üles kõik asjakohased tähelepanekud (näiteks koe lahtikoordumine, uuritava aine jäägid, ebahühtlaselt jaotunud hägusus). Sellised tähelepanekud võivad olla olulised, kuna osutatud muutused võivad mõjutada hägususe mõõtmise näitu.

Kontrollained

33. Igas katses tehakse paralleelseid mõõtmisi ka negatiivse või lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli ja positiivse kontrolli ainetega.
34. BCOP-katse läbiviimisel 100-protsendilise vedela ainega tehakse paralleelselt negatiivse kontrolli katse (näiteks 0,9 % naatriumkloriidi lahuse või destilleeritud veega), et kindlaks teha mittespetsiifiliste muutuste esinemine testsüsteemis ja saada võrdlusväärtused katse tulemusnäitajate jaoks. Sellega tõendatakse ka, et katsetingimused ise ei põhjusta muutusi, mida ekslikult võiks ärrituseks pidada.
35. BCOP-katse läbiviimisel lahjendatud vedeliku, pindaktiivse aine või tahke ainega tehakse paralleelselt lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli katse, et kindlaks teha mittespetsiifiliste muutuste esinemine testsüsteemis ja saada võrdlusväärtus katse tulemusnäitaja jaoks. Katses võib kasutada ainult sellist lahustit/pealekandmisvahendit, mille kohta on tõendatud, et see ei avalda negatiivset mõju katsesüsteemile.
36. Igas eksperimendis tehakse paralleelselt ka positiivse kontrolli katse silmi teadaolevalt ärritava ainega, et tõendada positiivse tulemuse saamist. Kuna käesolevas katsemeetodis kasutatakse BCOP-katset soovitatavate või tugevasti ärritavate ainete kindlakstegemiseks, peaks positiivse kontrolli aine soovitatavalt olema kontrollaine, mis selle katsemeetodi puhul põhjustab tugeva mõju. Kuid selleks, et oleks võimalik hinnata ka positiivse kontrolli aine mõju sõltuvust ajast, ei tohiks ärritav mõju olla ülemäära suur.
37. Vedela uuritava aine korral on positiivse kontrolli aineks näiteks dimetüülformamiid või 1 % naatriumhüdroksiid. Tahke uuritava aine korral on positiivse kontrolli aineks näiteks 20 % (mass/ruumala) imidasool 0,9 % naatriumkloriidi lahuses.

▼ **M2**

38. Võrdlusained võimaldavad hinnata teatava kemikaali- või tooteklassi uuri-mata kemikaali omadust põhjustada silmade ärritust või hinnata teatava silmi ärritava aine mõju tugevust teatavas ärritava toime vahemikus.

Mõõdetavad tulemusnäitajad

39. Hägusus määratakse sarvkesta läbinud valgushulga mõõtmisega. Sarvkesta hägusust mõõdetakse hägususemõõtja abil, millega saadakse hägususe väärtused pidevas skaalas.
40. Läbilaskvust määratakse värvaine naatriumfluorestseiini hulga järgi, mis tungib läbi kõigi sarvkesta kihtide (st sarvkesta välispinnal asuvast epiteelist kuni sisepinnal asuva endoteelini). Sarvkestahoidja eespoolsesse kambrisse, mille poole on sarvkesta epiteliaalne külg, lisatakse 1 ml naatriumfluorestseiini lahust (4 mg/ml, kui uuritav aine on vedelik või pindaktiivne aine, ja 5 mg/ml, kui see on pindaktiivsete omadusteta tahke aine), samas kui tagapoolne kamber, mille poole on endotelialne külg, täidetakse värske EMEM-lahusega. Seejärel inkubeeritakse sarvkestahoidjat horisontaalasendis 90 ± 5 minutit 32 ± 1 °C juures. UV/VIS-spektrofotomeetriliselt mõõdetakse tagapoolsesse kambrisse tunginud naatriumfluorestseiini kogus. 490 nm juures läbiviidavate spektrofotomeetriliste mõõtmiste tulemused registreeritakse optilise tiheduse (OD_{490}) või valguse neeldumise ühikutes pidevas skaalas. Fluorestseiini läbilaskvuse väärtused määratakse OD_{490} väärtustest, mis määratakse nähtava valguse spektrofotomeetriga, kasutades standardseid küvette optilise tee pikkusega 1 cm.
41. Selle asemel võib kasutada 96-augulise mikrotiiterplaadi lugejat, kui: i) on võimalik näidata, et fluorestseiini määramisel on OD_{490} väärtused plaadilugeja lineaarses piirkonnas, ja ii) 96-augulisel mikrotiiterplaadil kasutatakse õiget fluorestseiiniproovi ruumala, nii et saadakse samad OD_{490} väärtused kui tavalise 1 cm küvetiga mõõtmisel (selleks tuleb auk (tavaliselt 360 ml) täita võib-olla ääreni).

ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmete hindamine**

42. Kui hägususe ja keskmise läbilaskvuse (OD_{490}) väärtused on parandatud tausthägususe ja negatiivse kontrolli läbilaskvuse OD_{490} väärtustega, tuleks iga katserühma keskmised hägususe ja läbilaskvuse OD_{490} väärtused asendada empiirilisel tuletatud võrrandisse, et arvutada *in vitro*-ärritavuse hinne (IVIS) iga katserühma jaoks:

IVIS = keskmise hägususe väärtus + $(15 \times \text{keskmise läbilaskvuse } OD_{490} \text{ väärtus})$

Sina jt (16) teavad, et selline võrrand tuletati laborisest ja laboritevaheliste uuringutega. 36 ainega läbiviidud laboritevahelise uuringu andmeid töödeldi mitmese korrelatsioonanalüüsi meetodiga, et leida *in vivo* ja *in vitro* saadud tulemuste seost kõige paremini kirjeldav võrrand. Kõnealuse analüüsi viisid läbi kahe ettevõtte teadlased, kes said peaaegu identsed võrrandid.

43. Hägususe ja läbilaskvuse väärtusi tuleks ka sõltumatult hinnata, et määrata kindlaks, kas uuritav aine põhjustas söövitust või tugevat ärritust ainult ühe kaudu kahest tulemusnäitajast (vt otsustamise kriteeriumid).

▼ **M2****Otsustuskriteeriumid**

44. Aine, mille IVIS $\geq 55,1$, tunnistatakse söövitavaks või tugevat ärritust põhjustavaks aineks. Nagu öeldud punktis 1, kui uuritavat ainet ei klassifitseerita silma söövitavaks või tugevasti ärritavaks aineks, tuleks aine klassifitseerimiseks ja etiketile kantava teabe saamiseks teha täiendavaid katseid. BCOP-katse üldine täpsus on 79 % (113/143) kuni 81 % (119/147), valepositiivsete tulemuste määr on 19 % (20/103) kuni 21 % (22/103) ja valenegatiivsete tulemuste määr 16 % (7/43) kuni 25 % (10/40), kui tulemusi võrrelda küüliku silma *in vivo*-katse tulemustega, mis on klassifitseeritud vastavalt EPA (1), ELi (2) või GHSi (3) klassifitseerimissüsteemidele. Kui teatavatesse kemikaaliklassidesse (alkoholid, ketoonid) või füüsikalisse klassi (tahked ained) kuuluvad ained andmebaasist kõrvale jätta, on ELi, EPA ja GHSi klassifitseerimissüsteemide kohaselt BCOP-katse täpsus 87 % (72/83) kuni 92 % (78/85), valepositiivsete tulemuste määr on 12 % (7/58) kuni 16 % (9/56) ja valenegatiivsete tulemuste määr on 0 % (0/27) kuni 12 % (3/26).
45. Isegi kui uuritavat ainet ei klassifitseerita silma söövitavaks või tugevasti ärritavaks aineks, võib BCOP-katse siiski olla kasulik koos andmetega, mis saadakse küüliku silma *in vivo*-katsega või muu korralikult valideeritud *in vitro*-katsega, kuna see aitab paremini hinnata BCOP-katse meetodi kasulikkust ja puudusi selliste ainete kindlakstegemisel, millel ei ole tugevasti ärritavat või ärritavat toimet (töötatakse välja suunisdokumenti silma suhtes toksilisuse määramise *in vitro*-katsemeetodite kohta).

Uuringu nõuetekohasuse kriteeriumid

46. Katse loetakse nõuetekohaseks, kui positiivne kontroll annab IVIS-väärtuse, mis asub kuni kahe standardhälbe kaugusel varasemate uuringute jooksvalt keskmisest, mida ajakohastatakse vähemalt iga kolme kuu järel või iga nõuetekohase katse läbiviimise järel laboris, kus katseid tehakse harva (harvem kui kord kuus). Negatiivse kontrolli või lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli katses saadud hägususe ja läbilaskvuse väärtused peavad olema madalamad kui tausthägususe ja läbilaskvuse väärtuse ülempiirid, mis on varem kindlaks tehtud veise sarvkestade puhul, mida on töödeldud negatiivse kontrolli või lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli ainetega.

Katseprotokoll

47. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave, kui see on uuringu läbiviimise seisukohast asjakohane:

Uuritavad ained ja kontrollained:

keemiline nimetus või keemilised nimetused, nagu struktuurikohane nimetus, mida kasutab *Chemical Abstracts Service* (CAS), seejärel muud nimetused, kui need on teada;

CASi registreerimisnumber (RN), kui on teada;

aine puhtus või segu koostis (massiprotsendina), kui võrd see on teada;

füüsikalised-keemilised omadused nagu füüsikaline olek, lenduvus, pH, püsivus, kemikaaliklass, lahustuvus vees, mis on olulised katse läbiviimise seisukohast;

uuritava aine/kontrollaine töötlemine enne katset, kui see on asjakohane (näiteks soojendamine, peenestamine);

püsivus, kui on teada.

▼ **M2**

Teave sponsori ja uurimisasutuse kohta:

sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;

silmade päritolu kirjeldus (asutus, milles need koguti);

silmade säilitamis- ja transporditingimused (näiteks silmade kogumise aeg, ajavahemik kogumisest katse alguseni, transpordivahend ja temperatuur transpordi ajal, kasutatud antibiootikumid);

silmade kogumiseks kasutatud loomade eritunnused, kui on teada (näiteks vanus, sugu, looma mass).

Kasutatud meetodi ja katse-eeskirja põhjendus

Katsemeetodi õigsus:

kasutatud katsemeetodi ajast sõltumatu õigsuse (st täpsuse ja usaldusväärsuse) tagamise meetod (s.o ained, millega katse läbiviimise oskust teatava ajavahemiku järel kontrollitakse, varasemate negatiivse ja positiivse kontrolli andmete kasutamine).

Katse kõlblikkuse kriteeriumid:

varasematel andmetel põhinevad paralleelse positiivse ja negatiivse kontrolli kõlblike tulemuste vahemikud;

võimaluse korral varasematel andmetel põhinevad kõlblike paralleelsete võrdlustulemuste vahemikud.

Katse tingimused:

kasutatud katsesüsteemi kirjeldus;

kasutatud sarvkestahoidja tüüp;

hägususe ja läbilaskvuse mõõtmiseks kasutatud mõõteriista (näiteks hägususe mõõtmise ja spektrofotomeetri) kaliibrimist käsitlev teave;

kasutatud veisesarvkesti käsitlev teave, seejuures nende kvaliteetsuse kinnitused;

kasutatud katsemeetodi üksikasjad,

uuritavate ainete kasutatud kontsentratsioonid;

kõikide katsetoodikas tehtud muudatuste kirjeldus;

viide varasematele mudeli andmetele (näiteks negatiivse ja positiivse kontrolli ained, katse läbiviimise oskuse kontrollimiseks kasutatud ained, võrdlusained);

kasutatud hindamiskriteeriumide kirjeldus.

Tulemused:

üksikutes katsetes saadud andmete tabel (näiteks hägususe ja OD₄₉₀ väärtused ning uuritava aine ja positiivse kontrolli, negatiivse kontrolli ning [võimaluse korral] võrdlusaine kontrolli jaoks arvatud IVIS-väärtused tabelina, sealhulgas vajaduse korral paralleelsete üksikute määramiste tulemused, iga katse keskvväärtused ja standardhälve);

muude täheldatud toimete kirjeldus.

Tulemuste arutelu

Kokkuvõte

KIRJANDUS

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.

▼ M2

- (2) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006. ELT L 353, 31.12.2008, lk 1.
- (3) UN (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Second revised edition, New York & Geneva: United Nations Publications, 2007. Vt
- [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. Vt
- [<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. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No. 07-4517. Vt
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.htm]
- (6) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1907/2006, 18. detsember 2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ning millega asutatakse Euroopa Kemikaaliamet, muudetakse direktiivi 1999/45/EÜ ja tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 793/93 ja komisjoni määrus (EÜ) nr 1488/94 ning samuti nõukogu direktiiv 76/769/EMÜ ja komisjoni direktiivid 91/155/EMÜ, 93/67/EMÜ, 93/105/EÜ ja 2000/21/EÜ. ELT L 396, 30.12.2006, lk 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Vt
- [http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html]
- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended BCOP Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Vt
- [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmter.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. NIH Publication No.: 06-4512. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Vt
- [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. Ispra, Italy: European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM).

▼ M2

- (11) Gautheron, P., Dukic, M., Alix, D. and Sina, J.F. (1992). Bovine corneal opacity and permeability test: An *in vitro* assay of ocular irritancy. *Fundam. Appl. Toxicol.* 18:442-449.
- (12) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Vt

[<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf>].
- (13) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester, J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.
- (14) Doughty, M.J., Petrou, S. and Macmillan, H. (1995). Anatomy and morphology of the cornea of bovine eyes from a slaughterhouse. *Can. J. Zool.* 73:2159-2165.
- (15) Collee, J. and Bradley, R. (1997). BSE: A decade on - Part I. *The Lancet* 349: 636-641.
- (16) Sina, J.F., Galer, D.M., Sussman, R.S., Gautheron, P.D., Sargent, E.V., Leong, B., Shah, P.V., Curren, R.D., and Miller, K. (1995). A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. *Fundam Appl Toxicol* 26:20-31.
- (17) 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. Vt

[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. Vt

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼ **M2**

1. liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. See on katsemeetodi kasutuskõlblikkuse üks näitajaid ja üks nn asjakohasuse aspekte. Terminit kasutatakse sageli vaheldumisi sõnaga „kooskõla”, mis tähendab katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu.

Võrdlusaine: aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusoo soovitavas mõju tugevuse vahemikus.

Sarvkest: silmamuna eespoelses osas asuv läbipaistev kest, mis katab vikerkesta ja silmaava ning laseb valgusel tungida silma sisse.

Sarvkesta hägusus: suurus, millega väljendatakse pärast sarvkesta kokkupuudet uuritava ainega toimuva hägustumise määra. Sarvkesta hägususe suurenemine näitab sarvkesta kahjustuse suurust. Hägusust võib hinnata subjektiivselt, nagu tehakse Draize küülikusilma katses, või objektiivselt aparaadiga, näiteks hägusumõõduga.

Sarvkesta läbilaskvus: sarvkesta epiteeli kahjustuse mõõtmise värvaine naatriumfluorestseini koguse järgi, mis tungib läbi kõigi sarvkesta kihtide.

USA keskkonnaameti (EPA) I kategooria: söövitav (silmakoe pöördumatu kahjustus) või sarvkesta mõjutav või ärritav, mis püsib rohkem kui 21 päeva (1).

ELi kategooria R41: koekahjustuse tekkimine silmas või tugev füüsiline nägemislangus pärast seda, kui uuritavat ainet on kantud silma eespoolele pinnale ja mõju ei ole täielikult pöörduv 21 päeva jooksul pärast aine pealekandmist (2).

Valenegatiivsete vastuste määr: kõikide selliste positiivsete ainete osakaal, mis katsemeetodi alusel on ekslikult tunnistatud negatiivseks. See on üks katsemeetodi kasutuskõlblikkuse näitaja.

Valepositiivsete vastuste määr: kõikide selliste negatiivsete ainete osakaal, mis katsemeetodi alusel on ekslikult tunnistatud positiivseks. See on üks katsemeetodi kasutuskõlblikkuse näitaja.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – kemikaalide ühtne ülemaailmne klassifitseerimis- ja märgistamissüsteem): süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud tüübile ja -tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogramm, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (3).

▼ **M2**

GHSi 1. kategooria: koekahjustuse tekkimine silmas või tugev füüsiline nägemislangus pärast seda, kui uuritavat ainet on kantud silma eespoolsele pinnale ja osutatud mõju ei ole täielikult pöörduv 21 päeva jooksul pärast aine pealekandmist (3).

Oht: mõjuri või olukorra loomupärane omadus tekitada kahjustust, kui organism, süsteem või (ala-)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

In vitro-ärritavuse hinne (In Vitro Irritancy Score, IVIS): BCOP-katses kasutatav katseliselt tuletatud valem, millega iga katserühma keskmise hägususe ja keskmise läbilaskvuse väärtused ühendatakse üheks kõnealusele katserühmale avaldatud mõju iseloomustavaks *in vitro*-hindeks (punktisummaks). IVIS = keskmine hägususe väärtus + (15 × keskmine läbilaskvuse väärtus)

Negatiivne kontroll: uuritava ainega töötlemata paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente. Sellist proovi töödeldakse koos proovidega, mida mõjutatakse uuritava ainega, ja koos muude kontrollproovidega, et kontrollida, ega lahusti ei mõjuta katsesüsteemi.

Ärritust mittepõhjustav aine: aine, mida ei ole klassifitseeritud EPA I, II ega III kategooriasse, ELi kategooriatesse R41 või R36 ega GHSi 1., 2.A või 2.B kategooriasse kuuluvaks silmärritajaks.

Silma söövitav aine: a) aine, mis põhjustab silma kudede pöördumatut kahjustust; b) aine, mis on klassifitseeritud GHSi 1. kategooriasse, EPA I kategooriasse või ELi kategooriasse R41 kuuluvaks silma ärritavaks aineks (1), (2), (3).

Silma ärritav aine: a) aine, mis põhjustab pärast silma eespoolsele pinnale kandmist silmas pöörduva muutuse; b) aine, mis on klassifitseeritud EPA II või III kategooriasse, ELi kategooriasse R36 või GHSi 2.A või 2.B kategooriasse kuuluvaks silma ärritavaks aineks (1), (2), (3).

Silma tugevasti ärritav aine: a) aine, mis põhjustab pärast silma eespoolsele pinnale kandmist silmas koekahjustuse, mis ei parane 21 päeva jooksul, või põhjustab tugeva füüsilise nägemislanguse; b) aine, mis on klassifitseeritud GHSi 1. kategooriasse, EPA I kategooriasse või ELi kategooriasse R41 kuuluvaks silma ärritavaks aineks (1), (2), (3).

Hägusumõõtja: aparaat sarvkesta hägususe mõõtmiseks sarvkesta läbinud valguse hulga kvantitatiivse hindamise alusel. Tüüpilisel seadmel on kaks mõõtmisruumi, millest kummalgi on oma valgusallikas ja fotoelement. Üht ruumi kasutatakse töödeldud sarvkesta mõõtmiseks; teine on aparaadi kalibreerimiseks ja nulliviimiseks. Halogeenlambi valgus suunatakse läbi võrdlusruumi (tühi kamber, millel ei ole aknaid ja milles ei ole vedelikku) fotoelemendile ja võrreldakse valgusega, mis on fotoelemendile suunatud läbi uuritava sarvkestaga ruumi. Fotoelementide andmete võrdlemisest saadakse valguse läbilaskvuse erinevus ja hägususe numbriline väärtus esitatakse digitaalsel näidikul.

Positiivne kontroll: paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida töödeldakse ainega, mis teadaolevalt põhjustab positiivse tulemuse. Selleks, et oleks võimalik hinnata ka positiivse kontrolli aine mõju sõltuvust ajast, ei tohiks mõju olla ülemäära suur.

▼ M2

Usaldusväärsus: sellega mõõdetakse katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Seda hinnatakse laborisisese ja laboritevahelise reprodutseeritavuse ja laborisisese korratavuse arvutamisega.

Lahusti/pealekandmisvahendi kontroll: uuritava ainega töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente, sealhulgas lahustit või pealekandmisvahendit; sellist proovi töödeldakse sarnaselt uuritava ainega töödeldud proovile ja muudele kontrollproovidele, et määrata kindlaks samas lahustis või pealekandmisvahendis lahustatud uuritava ainega töödeldud proovide nulljoone tase. Kui paralleelselt katsetatakse negatiivse kontrolli proovi, siis näitab lahusti/pealekandmisvahendi proov ka seda, kas lahusti või pealekandmisvahend mõjutab katsesüsteemi.

Astmeline katsetamine: samm-sammulise katsetamise strateegia, milles enne järgmise etappi minekut vaadatakse kindlaksmääratud korras läbi kogu uuritava aine kohta olemasolev teave, kasutades igas etapis tõendite kaalukuse menetlust, et määrata kindlaks, kas on piisavalt teavet riskirühma klassifitseerimise otsuse tegemiseks. Kui olemasoleva teabe põhjal saab uuritava aine ärritavate omaduste kohta otsuse teha, ei ole edasisi katseid vaja teha. Kui olemasoleva teabe põhjal ei saa teha otsust uuritava aine ärritavate omaduste kohta, jätkatakse samm-sammult järjestikuste loomkatsete tegemist, kuni aine saab üheselt klassifitseerida.

Valideeritud katsemeetod: katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi puhul. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusvääruse osas, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi puhul.

Tõendusmaterjali kaalukuse hindamine: protsess, milles kaalutakse mitmesuguste andmete tugevaid ja nõrku külgi, et jõuda otsuseni aine võimaliku ohtlikkuse kohta ja toetada sellist otsust.

▼M2

2. liide

Ained, millega kontrollitakse BCOP-meetodi valdamist

Enne kõnealuse meetodiga seotud katsemeetodi tavakasutusse võtmist võivad laborid soovida tõendada meetodi tehnilist valdamist ja määrata selleks õigesti tabelis 1 soovitatud 10 aine klassifikatsioon söövitava toime järgi. Kõnealused ained on valitud nii, et oleks esindatud silma paikse ärrituse/söövituse põhjustamise kogu skaala, mis põhineb küüliku silmaga *in vivo*-katsetes (TG 405) saadud tulemustel (st 1., 2.A ja 2.B kategooria või ÜRO GHSi kohaselt „klassifitseerimata ja märgiseta”) (3), (7). Pidades aga silmas kõnealuste katsete valideeritud kasulikkust (tehakse kindlaks vaid silma söövitavad või tugevasti ärritavad ained), on meetodi valdamise tõendamisel tegemist vaid kahe suguste tulemustega klassifitseerimise seisukohast (söövitav / tugevasti ärritav või mittesöövitav / silma mitte tugevasti ärritav). Muud valikukriteeriumid olid järgmised: ained peaksid olema kaubanduses saadaval, nende kohta peaksid olema kvaliteetsed *in vivo*-võrdlusandmed ning on kvaliteetsed andmed, mis on määratud kahe *in vitro*-meetodiga, mille jaoks on välja töötatud katse läbiviimise suunised. Seepärast valiti ärritavad ained 122 võrdlusaine nimestikust, mida ICCVAM soovib kasutada silma suhtes toksilisuse *in vitro*-katsete valideerimiseks (vt H liide: ICCVAMi soovitatud võrdlusained) (5). Võrdlusandmeid on esitatud ka ICCVAMi taustilevaatedokumentides BCOP-katse ja isoleeritud kanasilma katse (*Isolated Chicken Eye test method*, ICE-katse) jaoks (17), (18).

Tabel 1

Soovitatud ained BCOP-meetodi tehnilise valdamise tõendamiseks

Aine	CASi nr	Ühendiklass (1)	Füüsikaline olek	<i>In vivo</i> -klassifikatsioon (2)	<i>In vitro</i> -klassifikatsioon (3)
Bensalkooniumkloriid (5 %)	8001-54-5	Ooniumühend	Vedel	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Kloorheksidiin	55-56-1	Amiin, amidiin	Tahke	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Dibensoüül-L-viinhape	2743-38-6	Karboksüülhappe ester	Tahke	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Imidasool	288-32-4	Heterotsükkel	Tahke	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Trikloroäädikhape (30 %)	76-03-9	Karboksüülhape	Vedel	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
2,6-Diklorobensoüülkloriid	4659-45-4	Atsüülhaliid	Vedel	2.A kategooria	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
Etüül-2-metüül-2-seto-atsetaat	609-14-3	Ketoon, ester	Vedel	2.B kategooria	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
Ammooniumnitraat	6484-52-2	Anorgaaniline sool	Tahke	2.A kategooria	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav

▼ **M2**

Aine	CASi nr	Ühendklass (1)	Füüsikaline olek	<i>In vivo</i> -klassifikatsioon (2)	<i>In vitro</i> -klassifikatsioon (3)
Glütserool	56-81-5	Alkohol	Vedel	Märgiseta	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
<i>n</i> -heksaan	110-54-3	Atsükliline süsivesinik	Vedel	Märgiseta	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav

Lühend: CASi nr – *Chemical Abstracts Service*'i number.

(1) Kemikaaliklass on igale uuritavale ainele omistatud standardse klassifitseerimiskeemi kohaselt, mis põhineb USA meditsiiniramatukogu meditsiiniteemade klassifitseerimissüsteemil (vt <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

(2) Vastavalt küüliku silma *in vivo*-katse (OECD TG 405) tulemustele ja kasutades ÜRO GHSi süsteemi (3), (7).

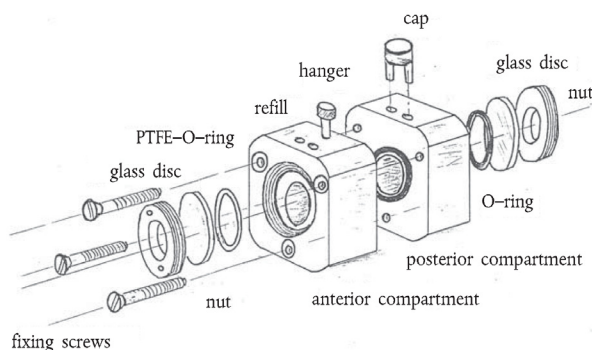
(3) Vastavalt BCOP-katse ja ICE-katse tulemustele.

▼ M2

3. liide

BCOP-KATSES KASUTATAV SARVKESTAHOIDJA

1. BCOP-katses kasutatav sarvestahoidja valmistatakse inertsest materjalist (näiteks polüpropüleenist). Sarvestahoidjal on kaks poolt (eespoolne ja tagapoolne kamber) ja nendes on sarnased silindrilised sisekambrid. Kummagi kambri ruumala on 5 ml ja kumbki kamber lõpeb klaasaknaga, läbi mille tehakse hägususe mõõtmisi. Kummagi sisekambriga diameeter on 1,7 cm ja pikkus 2,2 cm⁽¹⁾. Tagapoolsele kambrile asetatud rõngastihendit kasutatakse lekete ärahoidmiseks. Sarvest paigutatakse endoteliaalse küljega tagapoolse kambriga rõngastihendile ja eespoolne kamber paigutatakse sarvesta epiteliaalsele küljele. Kambrid hoiavad koos kolm roostevabast terasest kruvi, mis asuvad kambri välisservadel. Kummagi kambri otsas on klaasaken, mida on võimalik eemaldada, et võimaldada hõlpsat juurdepääsu sarvestale. Üks rõngastihend on ka klaasakna ja kambri vahel, et vältida lekkimist. Kaks ava kummagi kambri ülemisel küljel võimaldavad lisada ja eemaldada lahustit ja uuritavat ainet. Töötlemise ja inkubeerimise ajal onavad suletud kummikorkidega.

*Sõnastik*

Glass disc: klaasketas

PTFE-O-ring: polütetrafluoroetüleenist rõngastihend

Refill: täitmisava

Hanger: hoidja

Cap: kork

Nut: kinnitusrõngas

O-ring: rõngastihend

Posterior compartment: tagapoolne kamber

Anterior compartment: eespoolne kamber

Fixing screws: kinnituskruvid

⁽¹⁾ Esitatud mõõtmega sarvestahoidjat kasutatakse 12–60 kuu vanuse lehma sarvesta puhul. Kui kasutatakse 6–12 kuu vanuse looma sarvesta, peaks sarvestahoidja olema projekteeritud nii, et kummagi kambri ruumala on 4 ml ning kummagi sisekambriga diameeter on 1,5 cm ja pikkus on 2,2 cm. Uue kujundusega sarvestahoidja puhul on väga oluline, et ainega kokkupuutuva sarvestaosa pindala ja tagapoolse kambri ruumala suhe oleks samasugune kui traditsioonilise sarvestahoidja puhul. Selle tagamine on oluline selleks, et määrata õigesti läbilaskvuse väärtused, mida kasutatakse IVIS-väärtuse arvutamiseks esitatud valemi järgi.

▼ M2**HÄGUSUSMÕÕTJA**

2. Hägusumõõtja on seade valguse läbilaskvuse mõõtmiseks. Halogeenlambi valgus suunatakse läbi võrdlusruumi (tühi kamber, millel ei ole aknaid ja milles ei ole vedelikku) fotoelemendile ja võrreldakse valgusega, mis on fotoelemendile suunatud läbi uuritava sarvkestaga ruumi. Fotoelementide andmete võrdlemisest saadakse valguse läbilaskvuse erinevus ja hägususe numbriline väärtus esitatakse digitaalsel näidikul. Tehakse kindlaks hägususeühikud.
3. Hägusumõõtja peaks tagama lineaarse sõltuvuse kogu hägususe lugemite vahemikus, mis ulatub ennustumudelil kirjeldatud eri klassifikatsioonides kasutatavate kriitiliste väärtusteni (st kuni kriitiliste väärtusteni, mille alusel aine tunnistatakse söövitavaks või tugevasti ärritavaks). Lineaarsete ja täpsete lugemite saamiseks kuni 78-80 hägususeühikuni on hägusumõõtja vaja kaliibrida, kasutades rida kaliibrimisfiltreid. Kaliibrimisfiltrid (hägusad polüesterlehed) pannakse kaliibrimiskambrisse (sarvkestahoidja, mis on projekteeritud kaliibrimisfiltri hoidmiseks) ja võetakse hägusumõõtja lugem. Kaliibrimiskamber on projekteeritud nii, et see hoiaks kaliibrimisfiltreid ligikaudu samas kohas valgusallika ja fotoelemendi vahel, milles asub sarvkest hägususe mõõtmise ajal. Hägusumõõtja kaliibritakse esmalt hägususe lugemile 0, kasutades kaliibrimiskambrist ilma kaliibrimisfiltrita. Seejärel paigutatakse kaliibrimiskambrisse üksikshaaval kolm eri kaliibrimisfiltrit ja mõõdetakse hägususe. Kaliibrimisfiltritega 1, 2 ja 3 tuleks saada nende ettenähtud hägususeväärtuste lugemid, vastavalt 75, 150 ja 225 hägususeühikut $\pm 5\%$.

▼ **M2****B.48. ISOLEERITUD KANASILMA MEETOD SILMA SÖÖVITAVATE JA TUGEVALT ÄRRITAVATE AINETE KINDLAKSTEGETMISEKS**

SISSEJUHATUS

1. Isoleeritud kanasilma meetod (*Isolated Chicken Eye*, ICE) on *in vitro*-katsemeetod, mida võib teatavalte asjaoludel ja teatavate piirangutega kasutada, et klassifitseerida aineid ja segusid silma söövitavaks ja tugevasti ärritavaks (1), (2), (3). Käesolevas katse-meetodis on tugevasti ärritava toimega aineks või seguks määratletud sellised, mis tekitavad küülikul pärast pealekandmist vähemalt 21 päeva püsiva silmakahjustuse. Katse-meetodit ei peeta küüliku silma *in vivo*-katse täieliku asendamise jaoks kõlblikuks; ICE-meetodit soovitatakse kasutada korrastatud astmelise katsetamise strateegia osana õigusliku klassifitseerimise ja märgistamise jaoks konkreetses kasutusvaldkonnas (4), (5). Käesoleva katse kohaselt positiivseid uuritavaid aineid ja segusid (6) võib klassifitseerida silma söövitavaks või tugevasti ärritavaks aineks ilma edasise katsetamiseta küülikutel. Negatiivse tulemuse andnud ainet on vaja katsetada küülikul, kasutades järjestikuste katsete strateegiat, mis on esitatud OECD katsesuunises 405 (7) (käesoleva lisa B.5 peatükk).
2. Käesoleva katsemeetodi eesmärk on kirjeldada menetlusi, mida kasutatakse uuritava aine võimaliku silma söövitava või tugevasti ärritava toime hindamiseks, tuginedes aine omadusele mõjuda toksiliselt värskest eraldatud kanasilmale. Toksilist mõju sarvestale mõõdetakse: i) hägususe kvalitatiivse hindamisega, ii) epiteelkahjustuse kvalitatiivse hindamisega, kasutades fluorestseini kandmist silma (fluorestseini peetumine silmas), iii) sarvesta paksuse suurenemise (turse) mõõtmisega ja iv) makroskoopilise morfoloogilise pinnakahjustuse kvalitatiivse hindamisega. Sarvesta hägusust, turset ja kahjustust hinnatakse pärast uuritava ainega kokkupuutumist individuaalselt ja seejärel andmed koondatakse silma ärritava toime klassifitseerimiseks.
3. ICE-meetodiga on uuritud ka silmaärritajaid, mille tekitatud kahjustused paranevad vähem kui 21 päevaga, samuti aineid, mis silmi ei ärrita. Kuid sellistesse kategooriatesse kuuluvate ainete puhul ei ole ICE-meetodi täpsust ja usaldusväärsust ametlikult hinnatud.
4. Mõisted on esitatud 1. liites.

ALGSED KAALUTLUSED JA PIIRANGUD

5. Käesolev katsemeetod põhineb alternatiivmeetodite valideerimise ametitevahelise koordineerimiskomitee (*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods*, ICCVAM) ICE-meetodi eeskirjal (8), mis töötati välja rahvusvahelise valideerimisuuringu alusel (4), (5), (9), millesse andsid oma panuse alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskus (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*, ECVAM), alternatiivmeetodite valideerimise Jaapani keskus (*Japanese Center for the Validation of Alternative Methods*, JaCVAM) ja Madalmaade uurimisinstituudi TNO toksikoloogia ja rakendusfarmakoloogia elukvaliteedi osakond. Eeskirja aluseks on avaldatud andmetest saadud teave, samuti TNOs praegu kasutatav eeskiri (10), (11), (12), (13), (14).

▼ M2

6. Käesoleva meetodi kindlakstehtud piirangud on seotud alkoholid valedegatiivsete tulemuste ning tahkete ainete ja pindaktiivsete ainete valenegatiivsete tulemuste määraga (vt punkt 47) (4). Kui osutatud kemikaalikklassidesse ja füüsikalistesse aineklassidesse kuuluvad ained andmebaasist välja jätta, suureneb ICE-meetodi täpsus ELi ja USA keskkonnaameti (EPA) klassifitseerimissüsteemi ning ka ülemaailmselt ühtlustatud klassifitseerimissüsteemi (GHS) järgi oluliselt (4). Pidades silmas kõnealuse katse eesmärki (teha üksnes kindlaks silmi söövitavad või tugevasti ärritavad ained), ei ole valenegatiivsed tulemused väga olulised, kuna selliseid aineid uuritakse reguleerivate asutuste nõuetest olenevalt edasi küülikutel või muudes korralikult valideeritud *in vitro*-katsetes, kasutades järjestikuste katsete strateegiat ja tõendite kaalukuse lähenemisviisi. Lisaks ei võimaldanud senine valideerimisandmebaas õigesti hinnata mõnesid kemikaali- või tooteklasse (näiteks segusid). Kuid teadlased võiksid kaaluda kõnealuse meetodi kasutamist kõigi uuritava materjali tüüpide, kaasa arvatud segude puhul, kusjuures positiivse tulemuse võiks lugeda tõendiks, et tegemist on silma söövitava või tugevasti ärritava toimega. Alkoholidega saadud positiivseid tulemusi tuleks võtta ettevaatusega, kuna nende puhul on oht mõju üle hinnata.
7. Kanasilmadega tehtavate toimingute puhul tuleks alati järgida katselaboris kohaldatavaid inimestelt ja loomadelt saadud materjalide, kaasa arvatud kudede ja koevedelike jne käsitsemise eeskirju ja korda. Soovitatakse kasutada üldisi laborite ettevaatusmeetmeid (15).
8. Katsemeetodi kasutatavust piirab asjaolu, et kuigi selle puhul võetakse arvesse mõnesid silmaga seotud mõjusid, mida on hinnatud küüliku silma ärritavuse katses, ja mingil määral ka mõjude tugevust, ei peegelda katse silma sidekesta ja vikerkesta kahjustusi. Kuigi ICE-katsega ei saa põhimõtteliselt hinnata sarvkestakahjustuste pöördumust, on küüliku silma uuringute alusel soovitatud kasutada sarvkestakahjustuse esialgset sügavust pöördumatu ja pöörduva mõju eristamiseks (16). Lõpuks ei võimalda ICE-katse hinnata ainete silmasattumisega kaasneva süsteemse toksilisuse võimalust.
9. Jätkatakse uuringuid ICE-katse kasulikkuse ja piirangute edasiseks iseloomustamiseks ainete puhul, millel ei ole silma tugevasti ärritavat või ärritavat toimet (vt ka punkt 48). Meetodi kasutajatel palutakse valideerimisorganisatsioonidele saata näidiseid ja/või andmeid, et ametlikult hinnata ICE-katse võimalikku muud tulevast kasutust, sealhulgas ka ainete puhul, millel ei ole silma tugevasti ärritavat või ärritavat toimet.
10. Iga labor, kes alustab katsemeetodi kasutamist, peaks oma taseme kontrollimiseks kasutama 2. liites esitatud kemikaale. Labor võib osutatud kemikaale kasutada selleks, et tõendada oma tehnilist pädevust ICE-katse läbiviimisel, enne kui ta esitab ICE-katsega saadud andmed regulatiivseks ohu klassifitseerimiseks.

KATSE PÕHIMÕTE

11. ICE-meetod on organotüüpne mudel, mille abil on lühiajaliselt võimalik säilitada kanasilma *in vitro*. Katsemeetodis hinnatakse uuritava aine põhjustatud kahjustust sarvkesta turse, hägususe tekkimise ja fluorestseini peetumise mõõtmisega. Viimase kahe näitaja puhul on tegemist kvalitatiivse hindamisega, sarvkesta turse analüüsi puhul on ette nähtud kvantitatiivne hindamine. Iga mõõtmise tulemus teisendatakse kas kvantitatiivseks punktisummaks (hindeks), mida kasutatakse üldise ärritavusnäitaja arvutamiseks, või omistatakse sellele kvalitatiivne kategooria, mida kasutatakse silma söövitava ja tugevasti ärritava toime *in vitro*-klassifikatsiooni omistamiseks. Kumbagi neist tulemustest võib kasutada selleks, et ennustada aine võimet söövitada või tugevasti ärritada silma *in vivo* (vt otsustamise kriteeriumid).

▼ **M2****Kanasilmade hankimise allikad, kasutatavate kanade vanus**

12. Kõnealuseks katseks on kasutatud silmi, mis on kogutud kanadelt tapamajas, kus need tapetakse inimtoiduks; see kõrvaldab katseloomade kasutamise vajaduse. Kasutatakse üksnes silmi, mis on võetud tervetelt lindudelt, keda peetakse sobivaks inimtoidus kasutamiseks.
13. Kuigi kanade sobivaima vanuse hindamiseks ei ole läbi viidud kontrollitud uuringut, on tavaliselt kasutatud kõnealuseks katseks tapamajas tapetud kevadisi kanu (st vanus umbes 7 nädalat, kaal 1,5–2,5 kg).

Silmade kogumine ja toimetamine laborisse

14. Pead tuleks kõrvaldada kohe pärast kanade uimastamist, tavaliselt elektrilöögiga, ja kõri läbilõikamist, et veri välja lasta. Labor peaks olema kohaliku tapamaja lähedal, nii et kanade pead saaks kiiresti toimetada tapamajast laborisse, et vältida miinimumini lagunemist ja/või bakteritega saastumisest tingitud kahjustused. Ajavahemik kanapeade kogumise ja silmade ICE-katses kasutamise vahel peaks olema võimalikult lühike (tavaliselt kuni kaks tundi), kusjuures tuleks tõendada, et katsetulemused ei sõltu konkreetsest ajavahemikust. Tulemuste aluseks on silmade valimise kriteeriumid ning positiivse ja negatiivse kontrolli katsetes saadud tulemused. Kõik katses kasutatud silmad peavad pärinema ühest ja samast silmade rühmast, mis on kogutud ühel konkreetsel päeval.
15. Kuna silmad eraldatakse laboris, veetakse kanade pead tervelt tapamajast laborisse toatemperatuuril plastkastides, milles niiskuse suurendamiseks on isotoonilise keedusoolalahusega niisutatud käterätid.

ICE-katses kasutatavate silmade valimise kriteeriumid

16. Silmad, millel kohe peale silmakoopast väljavõtmist on kõrge fluorestseini värvumise näitaja (üle 0,5) või sarvkesta hägususe hinne (üle 0,5), jäetakse kõrvale.
17. Igas katserühmas ja paralleelselt läbiviidavas positiivse kontrolli katses kasutatakse vähemalt kolme silma. Negatiivse kontrolli rühmas või lahusti kontrollis (kui kasutatakse muud lahustit kui keedusoolalahust) kasutatakse vähemalt ühte silma.

KATSE KÄIK**Silmade ettevalmistamine**

18. Silmalaud lõigatakse hoolikalt ära, vältides sarvkesta vigastamist. Sarvkesta kvaliteeti kontrollitakse kiiresti ühe tilga 2 % (mass/ruumala) naatriumfluorestseini lahusega, mis kantakse sarvkesta pinnale mõneks sekundiks ja loputatakse siis maha isotoonilise keedusoolalahusega. Fluorestseiniiga töödeldud silmi vaadeldakse siis pilulamp-mikroskoobiga, et teha kindlaks, et sarvkest on vigastamata (st fluorestseini peetumine ja sarvkesta hägususe hinne on $\leq 0,5$).
19. Kui sarvkest on vigastamata, jätkatakse silma väljalõikamist silmakoopast, vältides sarvkesta vigastamist. Silmamuna tõmmatakse silmakoopast välja, hoides pilkekilet kindlalt kirurgitangidega, ja silmalihased lõigatakse läbi painutatud nüriotsaliste kääridega. Oluline on vältida sarvkesta vigastust liigse rõhu tõttu (st kokkusurumisest tingitud artefakte).
20. Kui silm on silmakoopast välja tõmmatud, tuleb silmamuna külge jätta nähtav osa silmanärvi. Kui silm on silmakoopast välja võetud, pannakse see filterpaberile ning lõigatakse ära pilkekile ja muud sidekoelised osad.

▼ **M2**

21. Väljavõetud silm paigutatakse roostevabast terasest silmahoidja klambri vahele, nii et sarvkest on vertikaalasendis. Silmahoidja pannakse seejärel tilgutusaparaadi (superfusiooniaparaadi) kambrisse (16). Silmahoidjad tuleb tilgutusaparaadis paigutada nii, et isotooniline keedusoolalahus niisutaks kogu sarvkesta. Tilgutusaparaadi kambrites tuleks hoida temperatuuri $32 \pm 1,5$ °C. 3. liites on esitatud tüüpilise tilgutusaparaadi ja silmahoidjate skeem; sellise aparaadi võib osta või valmistada ise. Aparaat võib muuta vastavalt iga labori vajadustele (näiteks vajaliku arvu silmade paigutamiseks aparaati).
22. Pärast tilgutusaparaati paigutamist kontrollitakse silmi uuesti pilulamp-mikroskoobiga, et nende hulgas ei oleks väljavõtmisega vigastatud silmi. Samal ajal mõõdetakse sarvkesta tipus sarvkesta paksus, kasutades pilulamp-mikroskoobi sügavusmõõtmisseadet. Asendatakse kõik järgmiste tunnustega silmad: i) fluorestseiini peetumise hinne üle 0,5, ii) sarvkesta hägusus üle 0,5 või iii) omavad muid kahjustuse tunnuseid. Osutatud kriteeriumide põhjal kõrvaldamata jäetud silmade hulgast kõrvaldatakse veel silmad, mille sarvkesta paksus kaldub üle 10 % kõrvale kõikide silmade kohta arvatud keskväärtusest. Töötajad peaksid arvestama, et pilu erineva laiuse korral võib pilulamp-mikroskoop anda tulemuseks erinevaid sarvkesta paksuse väärtusi. Pilu laiuseks tuleb seada 0,095 mm.
23. Kui kõik silmad on üle vaadatud ja kõlblikuks tunnistatud, inkubeeritakse neid umbes 45–60 minutit, et need saavutaksid katsesüsteemiga tasakaalu, enne kui neile uuritav aine peale kantakse. Pärast tasakaalustumist mõõdetakse sarvkesta paksuse ja hägususe võrdlustase (0-tase), mis jääb baasjooneks (väärtused ajahetkel 0). Väljalõikamise ajal määratud fluorestseiini peetumise hinnat kasutatakse kõnealuse tulemusnäitaja baasjoonena.

Uuritava aine pealekandmine

24. Kohe peale võrdlustaseme (0-taseme) mõõtmist võetakse silm (koos silmahoidjaga) tilgutusaparaadist välja, pannakse horisontaalasendisse ja uuritav aine kantakse sarvkestale.
25. Vedelaid uuritavaid aineid mõõdetakse tavaliselt lahjendamata kujul, kuid neid võib ka lahjendada, kui seda peetakse vajalikuks (näiteks kui see on osa katse korraldusest). Eelistatud lahusti ainete lahjendamiseks on füsioloogiline keedusoolalahus. Kontrollitud tingimustes võib kasutada ka muid lahusteid, kuid muude lahustite kui füsioloogilise keedusoolalahuse sobivust on vaja tõendada.
26. Vedelad uuritavad ained kantakse sarvkestale nii, et kogu sarvkesta pind on uuritava ainega ühtlaselt kaetud; tavaline ruumala on 0,03 ml.
27. Tahked ained tuleks jahvatada võimalikult peeneks uhmrinuiaga või muu peenestamisvahendiga. Pulber kantakse sarvkestale niimoodi, et pind oleks uuritava ainega ühtlaselt kaetud; tavaline kogus on 0,03 g.
28. Uuritav (vedel või tahke) aine kantakse 10 sekundiks peale ja loputatakse siis silma pealt maha toatemperatuuril oleva isotoonilise keedusoolalahusega (umbes 20 ml). Silm (koos silmahoidjaga) pannakse seejärel tagasi tilgutusaparaati esialgsesse vertikaalasendisse.

Kontrollained

29. Igas katses tuleks teha paralleelseid mõõtmisi ka negatiivse või lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli ja positiivse kontrolli ainetega.

▼ **M2**

30. 100-protsendilise vedeliku või tahke aine uurimise korral kasutatakse ICE-katses paralleelse negatiivse kontrollina füsioloogilist keedusoolalahust, et teha kindlaks katsesüsteemi mittespetsiifilisi muutusi ning tõendada, et katsetingimused ise ei tekita ekslikult ärritusnähtusid.
31. Lahjendatud vedeliku uurimise korral tehakse ICE-katses paralleelselt lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli katse, et teha kindlaks katsesüsteemi mittespetsiifilisi muutusi ning tõendada, et katsetingimused ise ei tekita ekslikult ärritusnähtusid. Nagu öeldud punktis 25, võib katses kasutada ainult sellist lahustit/pealekandmisvahendit, mille kohta on tõendatud, et see ei avalda negatiivset mõju katsesüsteemile.
32. Igas eksperimendis tehakse paralleelselt ka positiivse kontrolli katse silmi teadaolevalt ärritava ainega, et tõendada positiivse tulemuse saamist. Kuna käesolevas katsemeetodis kasutatakse ICE-katset söövitavate või tugevasti ärritavate ainete kindlakstegemiseks, peaks positiivse kontrolli aine olema võrdlusaine, mis selle katsemeetodi puhul põhjustab tugeva mõju. Kuid selleks, et oleks võimalik hinnata ka positiivse kontrolli aine mõju sõltuvust ajast, ei tohiks mõju olla ülemäära suur. Positiivse kontrolli kohta tuleks saada piisaval hulgal *in vitro*-andmeid, nii et saaks arvutada positiivse kontrolli väärtuste statistiliselt määratletud vahemiku. Kui konkreetse positiivse kontrolli jaoks ei ole piisavalt varasemaid täpseid ICE-katse andmeid, võib sellise teabe saamiseks olla vaja korraldada eraldi uuringuid.
33. Vedelate uuritavate ainete positiivse kontrolli näideteks on 10 % äädikhape või 5 % bensalkooniumkloriid; tahkete uuritavate ainete positiivse kontrolli näideteks on naatriumhüdroksiid või imidasool.
34. Võrdlusained võimaldavad hinnata teatavas kemikaali- või tooteklassi kuuluva uurimata kemikaali omadust põhjustada silmade ärritust või hinnata teatava silmi ärritava aine mõju tugevust teatavas ärritava toime vahemikus.

Mõõdetavad tulemusnäitajad

35. Sarvkesti hinnatakse enne uuritava ainega töötlemist ning 30, 75, 120, 180 ja 240 minutit (\pm 5 minutit) pärast töötlemisejärgset loputamist. Sellised mõõtmiste ajad annavad vajaliku hulga mõõtmisi töötlemisele järgneva neljatunnilise ajavahemiku jooksul; samas jääb mõõtmiste vahele piisavalt aega, et nõutavad vaatlused saaks teha kõikide silmadega.
36. Mõõdetakse järgmisi tulemusnäitajaid: sarvkesta hägusus, turse, fluorestseini peetumine ja morfoloogilised muutused (näiteks epiteeli augustumine või lahtikoorumine). Kõiki tulemusnäitajaid peale fluorestseini peetumise (mida määratakse ainult enne töötlemist ja 30 minutit pärast kokkupuudet uuritava ainega) määratakse igal eespool osutatud ajahetkel.
37. Sarvkesta hägususe, fluorestseini peetumise, morfoloogiliste muutuste ja histopatoloogia (kui seda uuritakse) muutusi on soovitatav dokumenteerida fotodega.
38. Peale viimast vaatlust nelja tunni pärast on soovitatav silmad konserveerida sobiva fiksaatoriga (näiteks puhverdatud neutraalse formaliiniga), et seda oleks võimalik histopatoloogiliselt uurida.

▼ M2

39. Sarvkesta turse määratakse sarvkesta paksuse mõõtmisega, kasutades pilulamp-mikroskoobile lisatud optilist paksusemõõtjat. Sarvkesta turse väljendatakse protsendina ja arvutatakse sarvkesta paksuse mõõtmisandmetest järgmise valemiga:

$$\left[\frac{\text{sarvkesta paksus ajahetkel } t - \text{sarvkesta paksus ajahetkel} = 0}{\text{sarvkesta paksus ajahetkel} = 0} \right] \times 100$$

40. Arvutatakse kõikide katses kasutatud silmade keskmine sarvkesta turse protsent iga uuritud ajahetke jaoks. Igal ajahetkel registreeritud kõige kõrgema keskmise sarvkestaturse hinde põhjal omistatakse igale uuritavale ainele üldine kategooriahinne.
41. Sarvkesta hägusus arvutatakse, kasutades hindamiseks kõige rohkem hägustunud sarvkestaosa pindala. Arvutatakse kõikide katses kasutatud silmade keskmine sarvkesta hägususe väärtus iga uuritud ajahetke jaoks. Igal ajahetkel registreeritud kõige kõrgema keskmise sarvkesta hägususe hinde põhjal omistatakse igale uuritavale ainele üldine kategooriahinne (tabel 1).

Tabel 1.

Sarvkesta hägususe hinne

Hinne	Vaatlusandmed
0	hägusust ei ole
0,5	väga nõrk hägusus
1	hajutatud või ebaselgete piirjoontega alad; vikerkesta detailid on selgelt nähtavad
2	kergesti märgatav poolläbipaistev ala; vikerkesta detailid on veidi ebaselged
3	sarvkest on tugevalt hägune; vikerkesta konkreetsed detailid ei ole nähtavad; pupilli suurus on vaevunähtav
4	sarvkest on täielikult hägune; pupilli ei ole näha

42. Keskmine fluorestseini peetumise väärtus arvutatakse kõikide katses kasutatavate silmade jaoks ainult ajahetke 30 minutit jaoks; osutatud väärtust kasutatakse igale uuritavale ainele üldise kategooriahinde omistamisel (tabel 2).

Tabel 2.

Fluorestseini peetumise hinne

Hinne	Vaatlusandmed
0	fluorestseini peetumist ei ole
0,5	üksikud rakud on väga nõrgalt värvunud
1	üksikuid värvunud rakke on hajusalt kogu töödeldud sarvkestal
2	värvunud üksikud rakud moodustavad värvumistsentreid või -laike
3	peetunud fluorestseiniiga sarvkestaalad moodustavad ulatuslikke laike

▼ **M2**

43. Morfoloogiline mõju hõlmab järgmist: „auklikud” sarvkesta epiteelirakud, lahtikoorunud epiteel, sarvkesta pinna karedaks muutumine ning uuritava aine „kleepumine” sarvkestale. Sellised nähtused võivad olla erineva raskusastmega ja esineda samaaegselt. Nende nähtuste klassifitseerimine on subjektiivne ja sõltub uurija tõlgendusest.

ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmete hindamine**

44. Sarvkesta hägususe ja turse ning fluorestseini peetumise tulemusi tuleb hinnata eraldi, et leida ICE-klass iga tulemusnäitaja jaoks. Iga tulemusnäitaja ICE-klassid koondatakse seejärel iga uuritava aine ärritavuse klassifikatsiooni saamiseks.

Otsustamiskriteeriumid

45. Kui iga tulemusnäitaja on hinnatud, saab eelnevalt määratud vahemike alusel omistada ICE-klassid. Sarvkesta paksuse (tabel 3), hägususe (tabel 4) ja fluorestseini peetumise (tabel 5) tõlgendamine nelja ICE-klassi kasutamisega toimub järgnevate skaalaastmete alusel:

Tabel 3.

Sarvkesta turse ICE-klassifitseerimise kriteeriumid

Keskmine sarvkesta turse (%) (*)	ICE-klass
0 kuni 5	I
> 5 kuni 12	II
> 12 kuni 18 (> 75 minutit pärast kokku puudet uuritava ainega)	II
> 12 kuni 18 (≤ 75 minutit pärast kokku puudet uuritava ainega)	III
> 18 kuni 26	III
> 26 kuni 32 (> 75 minutit pärast kokku puudet uuritava ainega)	III
> 26 kuni 32 (≤ 75 minutit pärast kokku puudet uuritava ainega)	IV
> 32	IV

(*) Sarvkesta turse hindeid saab kasutada ainult siis, kui sarvkesta paksus on mõõdetud pilulamp-mikroskoobiga Haag-Streit BP900, kasutades sügavusmõõtmisseadet nr I ja pilulaiust 9½, mis vastab 0,095 millimeetrile. Töötajad peaksid arvestama, et pilu erineva laiuse korral võib pilulamp-mikroskoop anda tulemuseks erinevaid sarvkesta paksuse väärtusi.

Tabel 4.

Sarvkesta hägususe ICE-klassifitseerimise kriteeriumid

Keskmine maksimaalse hägususe hinne (*)	ICE-klass
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–4,0	IV

(*) Vt tabel 1.

▼ M2

Tabel 5.

Fluorestseini peetumise ICE-klassifitseerimise kriteeriumid

Keskmine fluorestseini peetumise hinne 30 minutit pärast kokkupuudet uuritava ainega (*)	ICE-klass
0,0–0,5	I
0,6–1,5	II
1,6–2,5	III
2,6–3,0	IV

(*) Vt tabel 2.

46. Uuritava aine üldine *in vitro*-ärritavuse klassifikatsioon hinnatakse ärritavusnäitajate kategooriate kombineerimisega, võttes arvesse sarvkesta turse, sarvkesta hägususe ja fluorestseini peetumise kategooriaid ning kasutades tabelis 6 esitatud skeemi.

Tabel 6.

Üldise *in vitro*-ärritavuse klassifikatsiooni määramine

Klassifikatsioon	Kolme tulemusnäitaja kombineerimine
Söövitav / tugevasti ärritav	3 × IV 2 × IV, 1 × III 2 × IV, 1 × II (*) 2 × IV, 1 × I (*) 30 minuti pärast sarvkesta hägusus ≥ 3 (vähemalt kahes silmas) Mingil ajahetkel sarvkesta hägusus = 4 (vähemalt kahes silmas) Epiteeli tugev lahtikoorumine (vähemalt ühes silmas)

(*) Ebatüüpilisemad kombinatsioonid

47. Nagu öeldud punktis 1, kui uuritavat ainet ei klassifitseerita silma söövitavaks või tugevasti ärritavaks aineks, tuleks aine klassifitseerimiseks ja etiketile kantava teabe saamiseks teha täiendavaid katseid. Silma söövitavate ja tugevasti ärritavate ainete kindlakstegemisel on ICE-katse üldine täpsus 83 % (120/144) kuni 87 % (134/154), valepositiivsete tulemuste määr on 6 % (7/116) kuni 8 % (9/116) ja valenegatiivsete tulemuste määr 41 % (13/32) kuni 50 % (15/30), kui tulemusi võrrelda küüliku silma *in vivo*-katse tulemustega, mis on klassifitseeritud vastavalt EPA (1), ELi (2) või GHSi (3) klassifitseerimissüsteemidele. Kui teatavatesse kemikaaliklassidesse (alkoholid ja pindaktiivsed ained) või füüsikalisse klassi (tahked ained) kuuluvad ained andmebaasist kõrvale jätta, on ELi, EPA ja GHSi klassifitseerimissüsteemide kohaselt ICE-katse täpsus 91 % (75/82) kuni 92 % (69/75), valepositiivsete tulemuste määr on 5 % (4/73) kuni 6 % (4/70) ja valenegatiivsete tulemuste määr on 29 % (2/7) kuni 33 % (3/9) (4).
48. Isegi kui uuritavat ainet ei klassifitseerita silma söövitavaks või tugevasti ärritavaks aineks, võib ICE-katse siiski olla kasulik koos andmetega, mis saadakse küüliku silma *in vivo*-katsega või muu korralikult valideeritud *in vitro*-katsega, kuna see aitab paremini hinnata ICE-katse meetodi kasulikkust ja puudusi selliste ainete kindlakstegemiseks, millel ei ole tugevasti ärritavat või ärritavat toimet (töötatakse välja suunisdokumenti silma toksilisuse *in vitro*-katsemeetodite kasutamise kohta).

▼ **M2****Uuringu nõuetekohasuse kriteeriumid**

49. Katse loetakse nõuetekohaseks, kui paralleelselt läbiviidud negatiivse kontrolli või pealekandmisvahendi / lahusti kontrolli katsed ja positiivse kontrolli katsed annavad ärritavuse klassifikatsiooni tulemused, mille kohaselt esimesel juhul on tegemist silma mitteärritavate ja teisel juhul silma tugevasti ärritavate / söövitavate ainetega.

Katseprotokoll

50. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave, kui see on uuringu läbiviimise seisukohast asjakohane:

Uuritavad ained ja kontrollained

keemiline nimetus või keemilised nimetused, nagu struktuurikohane nimetus, mida kasutab *Chemical Abstracts Service* (CAS), seejärel muud nimetused, kui need on teada;

CASi registreerimisnumber (RN), kui on teada;

aine puhtus või segu koostis (massiprotsendina), kui võrd see on teada;

füüsikalised-keemilised omadused nagu füüsikaline olek, lenduvus, pH, püsivus, kemikaalikklass, lahustuvus vees, mis on olulised katse läbiviimise seisukohast;

uuritava aine / kontrollaine töötlemine enne katset, kui see on asjakohane (näiteks soojendamine, peenestamine);

püsivus, kui on teada.

Teave sponsori ja uurimisasutuse kohta

sponsori, katselabori ja uuringu juhi nimi ja aadress;

silmade päritolu kirjeldus (näiteks asutus, milles need koguti);

silmade säilitamis- ja transporditingimused (näiteks silmade kogumise aeg, ajavahemik kogumisest katse alguseni);

silmade kogumiseks kasutatud lindude eritunnused, kui on teada (näiteks lindude vanus, sugu, mass).

*Kasutatud meetodi ja katse-eeskirja põhjendus**Katsemeetodi õigsus*

Kasutatud katsemeetodi ajast sõltumatu õigsuse (st täpsuse ja usaldusväärsuse) tagamise meetod (s.o ained, millega katse läbiviimise oskust teatava ajavahemiku järel kontrollitakse, varasemate negatiivse ja positiivse kontrolli andmete kasutamine).

Katse kõlblikkuse kriteeriumid

võimaluse korral varasematel andmetel põhinevad kõlblike paralleelsete võrdlustulemuste vahemikud.

Katse tingimused

kasutatud katsesüsteemi kirjeldus;

kasutatud pilulamp-mikroskoop (näiteks mudel);

kasutatud pilulamp-mikroskoobi seaded;

kasutatud kanasilmi käsitlev teave, seejuures nende kvaliteetsuse kinnitused;

▼ M2

kasutatud katsemeetodi üksikasjad,

uuritavate ainete kasutatud kontsentratsioonid;

kõikide katsetoodikas tehtud muudatuste kirjeldus;

viide varasematele mudeli andmetele (näiteks negatiivse ja positiivse kontrolli ained, katse läbiviimise oskuse kontrollimiseks kasutatud ained, võrdlusained);

kasutatud hindamiskriteeriumide kirjeldus.

Tulemused

muude täheldatud toimete kirjeldus;

vajaduse korral silmade fotod.

*Tulemuste arutelu**Kokkuvõte*

KIRJANDUS

- (1) U.S. EPA (1996). Label Review Manual: 2nd Edition. EPA737-B-96-001. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency.
- (2) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006. ELT L 353, 31.12.2008, lk 1.
- (3) United nations (UN) (2007). Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), Second revised edition, UN New York and Geneva, 2007. Vt
[\[http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev02/02files_e.html\]](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. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No. 07-4517. Vt
[\[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_tmer.htm\]](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. Vt
[\[http://ecvam.jrc.it/index.htm\]](http://ecvam.jrc.it/index.htm).
- (6) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1907/2006, 18. detsember 2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ning millega asutatakse Euroopa Kemikaaliamet, muudetakse direktiivi 1999/45/EÜ ja tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 793/93 ja komisjoni määrus (EÜ) nr 1488/94 ning samuti nõukogu direktiiv 76/769/EMÜ ja komisjoni direktiivid 91/155/EMÜ, 93/67/EMÜ, 93/105/EÜ ja 2000/21/EÜ. ELT L 396, 30.12.2006, lk 1.
- (7) OECD (2002). Test Guideline 405. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Acute eye irritation/corrosion. Vt
[\[http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html\]](http://www.oecd.org/document/40/0,2340,en_2649_34377_37051368_1_1_1_1,00.html)

▼ M2

- (8) ICCVAM (2007). ICCVAM Recommended ICE Test Method Protocol. In: ICCVAM Test Method Evaluation Report - *In Vitro* Ocular Toxicity Test Methods for Identifying Ocular Severe Irritants and Corrosives. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). NIH Publication No.: 07-4517. Vt

[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. NIH Publication No.: 06-4513. Research Triangle Park: National Toxicology Program. Vt

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_ice.htm]

- (10) Prinsen, M.K. and Koëter, B.W.M. (1993). Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Fd. Chem. Toxicol.* 31:69-76.

- (11) INVITTOX (1994). Protocol 80: Chicken enucleated eye test (CEET). Vt

[<http://ecvam.jrc.it/index.htm>].

- (12) Balls, M., Botham, P.A., Bruner, L.H. and Spielmann H. (1995). The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test. *Toxicol. In Vitro* 9:871-929.

- (13) Prinsen, M.K. (1996). The chicken enucleated eye test (CEET): A practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food Chem. Toxicol.* 34:291-296.

- (14) Chamberlain, M., Gad, S.C., Gautheron, P. and Prinsen, M.K. (1997). IRAG Working Group I: Organotypic models for the assessment/prediction of ocular irritation. *Food Chem. Toxicol.* 35:23-37.

- (15) Siegel, J.D., Rhinehart, E., Jackson, M., Chiarello, L., and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (2007). Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings. Vt

[<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/pdf/isolation2007.pdf>].

- (16) Maurer, J.K., Parker, R.D. and Jester J.V. (2002). Extent of corneal injury as the mechanistic basis for ocular irritation: key findings and recommendations for the development of alternative assays. *Reg. Tox. Pharmacol.* 36:106-117.

- (17) Burton, A.B.G., M. York and R.S. Lawrence (1981). The *in vitro* assessment of severe irritants. *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. Vt

[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. Vt

[http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/ivocutox/ocu_brd_bcop.htm]

▼ **M2***1. liide***MÕISTED**

Täpsus: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. See on katsemeetodi kasutuskõlblikkuse üks näitajaid ja üks nn asjakohasuse aspekte. Terminit kasutatakse sageli vaheldumisi sõnaga „kooskõla”, mis tähendab katsemeetodiga saadud õigete tulemuste osakaalu.

Võrdlusaine: aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritavate ainetega; iii) teadaolevad füüsilised ja keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusoo soovitavas mõju tugevuse vahemikus.

Sarvkest: silmamuna eespooles osas asuv läbipaistev kest, mis katab vikerkesta ja silmaava ning laseb valgusel tungida silma sisse.

Sarvkesta hägusus: suurus, millega väljendatakse pärast sarvkesta kokkupuudet uuritava ainega toimuva hägustumise määra. Sarvkesta hägususe suurenemine näitab sarvkesta kahjustuse suurust.

Sarvkesta turse: ICE-katse puhul objektiivselt mõõdetav suurus, millega väljendatakse pärast sarvkesta kokkupuudet uuritava ainega toimuva sarvkesta paisumise määra. See väljendatakse protsendina ja arvutatakse ICE-katse enne töötlemist mõõdetud sarvkesta paksuse ja pärast uuritava ainega kokkupuudet korrapäraste ajavahemike järel mõõdetud sarvkesta paksuse andmetest. Sarvkesta turse ulatus näitab sarvkesta kahjustuse suurust.

EPA I kategooria: söövitus (silmakoe pöördumatu kahjustus) või sarvkesta mõjutus või ärritus, mis püsib rohkem kui 21 päeva (1).

ELi kategooria R41: koekahjustuse tekkimine silmas või tugev füüsiline nägemislangus pärast seda, kui uuritavat ainet on kantud silma eespoolele pinnale ja mõju ei ole täielikult pöörduv 21 päeva jooksul pärast aine pealekandmist (2).

Valenegatiivsete vastuste määr: kõikide selliste positiivsete ainete osakaal, mis katsemeetodi alusel on ekslikult tunnistatud negatiivseks. See on üks katsemeetodi kasutuskõlblikkuse näitaja.

Valepositiivsete vastuste määr: kõikide selliste negatiivsete ainete osakaal, mis katsemeetodi alusel on ekslikult tunnistatud positiivseks. See on üks katsemeetodi kasutuskõlblikkuse näitaja.

Fluorestseini peetumine: ICE-katse puhul subjektiivselt hinnatav suurus, millega väljendatakse pärast sarvkesta kokkupuudet uuritava ainega toimuva naatriumfluorestseini epiteelirakkudes peetumise määra. Fluorestseini peetumise määr näitab sarvkesta epiteeli kahjustuse suurust.

GHS (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – kemikaalide ühtne ülemaailmne klassifitseerimis- ja märgistamissüsteem): süsteem, milles kemikaalid (ained ja segud) on klassifitseeritud vastavalt nende füüsilise ohtlikkuse ning kahjuliku tervise- ja keskkonnamõju standarditud tüübile ja -tasemele ning mis hõlmab asjaomaseid teavitustähiseid, nagu piktogramm, märksõnad, ohulaused, hoiatuslaused ja ohutuskardid, et anda edasi inimeste (sealhulgas tööandjate, töötajate, vedajate, tarbijate ja päästetöötajate) ja keskkonna kaitsmiseks vajalikku teavet kõnealuste kemikaalide kahjuliku mõju kohta (3).

▼ **M2**

GHSi 1. kategooria: koekahjustuse tekkimine silmas või tugev füüsiline nägemislangus pärast seda, kui uuritavat ainet on kantud silma eespoolsele pinnale ja mõju ei ole täielikult pöörduv 21 päeva jooksul pärast aine pealekandmist (3).

Oht: mõjuri või olukorra loomupärane omadus tekitada kahjustust, kui organism, süsteem või (ala-)populatsioon selle mõjuriga kokku puutub.

Negatiivne kontroll: uuritava ainega töötlemata paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente. Sellist proovi töödeldakse koos proovidega, mida mõjutatakse uuritava ainega, ja koos muude kontrollproovidega, et kontrollida, ega lahusti ei mõjuta katsesüsteemi.

Ärritust mittepõhjustav aine: aine, mida ei ole klassifitseeritud EPA I, II ega III kategooriasse, ELi kategooriasse R41 või R36 ega GHSi 1., 2.A või 2.B kategooriasse kuuluvaks silmärritajaks (1), (2), (3).

Silma söövitav aine: a) aine, mis põhjustab silma kudede pöördumatut kahjustust; b) aine, mis on klassifitseeritud GHSi 1. kategooriasse, EPA I kategooriasse või ELi kategooriasse R41 kuuluvaks silma ärritavaks aineks (1), (2), (3).

Silma ärritav aine: a) aine, mis põhjustab pärast silma eespoolsele pinnale kandmist silmas pöörduva muutuse; b) aine, mis on klassifitseeritud EPA II või III kategooriasse, ELi kategooriasse R36 või GHSi 2.A või 2.B kategooriasse kuuluvaks silmärritajaks (1), (2), (3).

Silma tugevasti ärritav aine: a) aine, mis põhjustab pärast silma eespoolsele pinnale kandmist silma kudede kahjustuse, mis ei ole pöörduv 21 päeva jooksul, või põhjustab tugeva füüsilise nägemislanguse; b) aine, mis on klassifitseeritud GHSi 1. kategooriasse, EPA I kategooriasse või ELi kategooriasse R41 kuuluvaks silma ärritavaks aineks (1), (2), (3).

Positiivne kontroll: paralleelproov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente ja mida töödeldakse ainega, mis teadaolevalt põhjustab positiivse tulemuse. Selleks, et oleks võimalik hinnata ka positiivse kontrolli aine mõju sõltuvust ajast, ei tohiks mõju olla ülemäära suur.

Usaldusvärsus: sellega mõõdetakse katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katseprotokolli alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Seda hinnatakse laborisisese ja laboritevahelise reprodutseeritavuse ja laborisisese korratavuse arutamiseks.

Pilulamp-mikroskoop: seade, mida kasutatakse silma otseseks vaatluseks; binokulaarmikroskoobiga saadakse suurendatud vertikaalne stereoskoopiline kujutis. ICE-katses kasutatakse seda seadet kanasilma eespoolsete struktuuride vaatlemiseks, samuti sarvkesta paksuse objektiivseks mõõtmiseks, kasutades lisaseadet – paksusemõõtjat.

Lahusti/pealekandmisvahendi kontroll: uuritava ainega töötlemata proov, mis sisaldab kõiki katsesüsteemi komponente, sealhulgas lahustit või pealekandmisvahendit; sellist proovi töödeldakse sarnaselt uuritava ainega töödeldud proovile ja muudele kontrollproovidele, et määrata kindlaks samas lahustis või pealekandmisvahendis lahustatud uuritava ainega töödeldud proovide nulljoonetase. Kui paralleelselt katsetatakse negatiivse kontrolli proovi, siis näitab lahusti/pealekandmisvahendi proov ka seda, kas lahusti või pealekandmisvahend mõjutab katsesüsteemi.

▼ M2

Astmeline katsetamine: samm-sammulise katsetamise strateegia, milles enne järgmise etapi minekut vaadatakse kindlaksmääratud korras läbi kogu uuritava aine kohta olemasolev teave, kasutades igas etapis tõendite kaalukuse menetlust, et määrata kindlaks, kas on piisavalt teavet riskirühma klassifitseerimise otsuse tegemiseks. Kui olemasoleva teabe põhjal saab uuritava aine ärritavate omaduste kohta otsuse teha, ei ole edasisi katseid vaja teha. Kui olemasoleva teabe põhjal ei saa teha otsust uuritava aine ärritavate omaduste kohta, jätkatakse samm-sammult järjestikuste loomkatsete tegemist, kuni aine saab üheselt klassifitseerida.

Valideeritud katsemeetod: katsemeetod, mille valideerimisuuringud on lõpule viidud, st on määratud selle asjakohasus (sealhulgas täpsus) ja usaldusväärsus konkreetse eesmärgi puhul. Oluline on märkida, et valideeritud katsemeetod ei tarvitse olla piisavalt kasutuskõlblik täpsuse ja usaldusväärsuse osas, et seda saaks lugeda vastuvõetavaks konkreetse eesmärgi puhul.

Tõendusmaterjali kaalukuse hindamine: protsess, milles kaalutakse mitmesuguste andmete tugevaid ja nõrku külgi, et jõuda otsuseni aine võimaliku ohtlikkuse kohta ja toetada sellist otsust.

▼ M2

2. liide

ICE-KATSE VALDAMISE KONTROLLIMISEKS SOOVITATAVAD KEMIKAALID

Enne käesoleva katsemeetodi kohase katsemeetodi tavakasutusse võtmist võivad laborid soovida tõendada meetodi tehnilist valdamist ja määrata selleks õigesti tabelis 1 soovitatud 10 aine klassifikatsioon söövitava toime järgi. Kõnealused ained on valitud nii, et oleks esindatud silma paikse ärrituse/söövituse põhjustamise kogu skaala, mis põhineb küüliku silmaga *in vivo*-katsetes (TG 405) saadud tulemustel (st 1., 2.A ja 2.B kategooria või ÜRO GHSi kohaselt „klassifitseerimata ja märgiseta”) (3), (7). Pidades aga silmas kõnealuste katsete valideeritud kasulikkust (tehakse kindlaks vaid silma söövitavad või tugevasti ärritavad ained), on meetodi valdamise tõendamisel tegemist vaid kahesuguste tulemustega klassifitseerimise seisukohast (söövitav/tugevasti ärritav või mittesöövitav/silma mitte tugevasti ärritav). Muud valikukriteeriumid olid järgmised: ained peaksid olema kaubanduses saadaval ja nende kohta peaksid olema kvaliteetsed *in vivo*-võrdlusandmed ning on olemas kvaliteetsed andmed, mis on määratud kahe *in vitro*-meetodiga, mille jaoks on välja töötatud katse läbiviimise suunised. Seepärast valiti ärritavad ained 122 võrdlusaine nimestikust, mida ICCVAM soovib kasutada silma toksilise *in vitro*-katsete valideerimiseks (vt H liide: ICCVAMi soovitatud võrdlusained) (4). Võrdlusandmeid on esitatud ka ICCVAMi taustilevateedokumentides veise sarvkesta hägususe ja läbilaskvuse meetodi (BCOP-katse) ja ICE-katsemeetodi jaoks (18), (19).

Tabel 1

Soovitatavad ained ICE-meetodi tehnilise valdamise tõendamiseks

Ühend	CASi nr	Ühendiklass (1)	Füüsikaline olek	<i>In vivo</i> -klassifikatsioon (2)	<i>In vitro</i> -klassifikatsioon (3)
Bensalkooniumkloriid (5 %)	8001-54-5	Ooniumühend	Vedel	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Kloorheksidiin	55-56-1	Amiin, amidiin	Tahke	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Dibensoüül-L-viin-hape	2743-38-6	Karboksüül-happe ester	Tahke	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Imidasool	288-32-4	Heterotsükkel	Tahke	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
Trikloroäädikhape (30 %)	76-03-9	Karboksüül-hape	Vedel	1. kategooria	Söövitav/tugevasti ärritav
2,6-diklorobensoüülkloriid	4659-45-4	Atsüülhaliid	Vedel	2.A kategooria	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
Etüül-2-metüülatsetaat	609-14-3	Ketoon, ester	Vedel	2.B kategooria	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
Ammooniumnitraat	6484-52-2	Anorgaaniline sool	Tahke	2.A kategooria	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav

▼ **M2**

Ühend	CASi nr	Ühendklass ⁽¹⁾	Füüsikaline olek	<i>In vivo</i> -klassifikatsioon ⁽²⁾	<i>In vitro</i> -klassifikatsioon ⁽³⁾
Glütserool	56-81-5	Alkohol	Vedel	Märgiseta	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav
<i>n</i> -heksaan	110-54-3	Atsükliline süsivesinik	Vedel	Märgiseta	Mittesöövitav/mitte tugevasti ärritav

Lühendid: CASi nr – *Chemical Abstracts Service*'i number.

⁽¹⁾ Kemikaaliklass on igale uuritavale ainele omistatud standardse klassifitseerimiskeemi kohaselt, mis põhineb USA meditsiiniramatukogu meditsiiniteemade klassifitseerimissüsteemil (vt <http://www.nlm.nih.gov/mesh>).

⁽²⁾ Vastavalt küüliku silma *in vivo*-katse (OECD TG 405) tulemustele ja kasutades ÜRO GHSi süsteemi (3), (7).

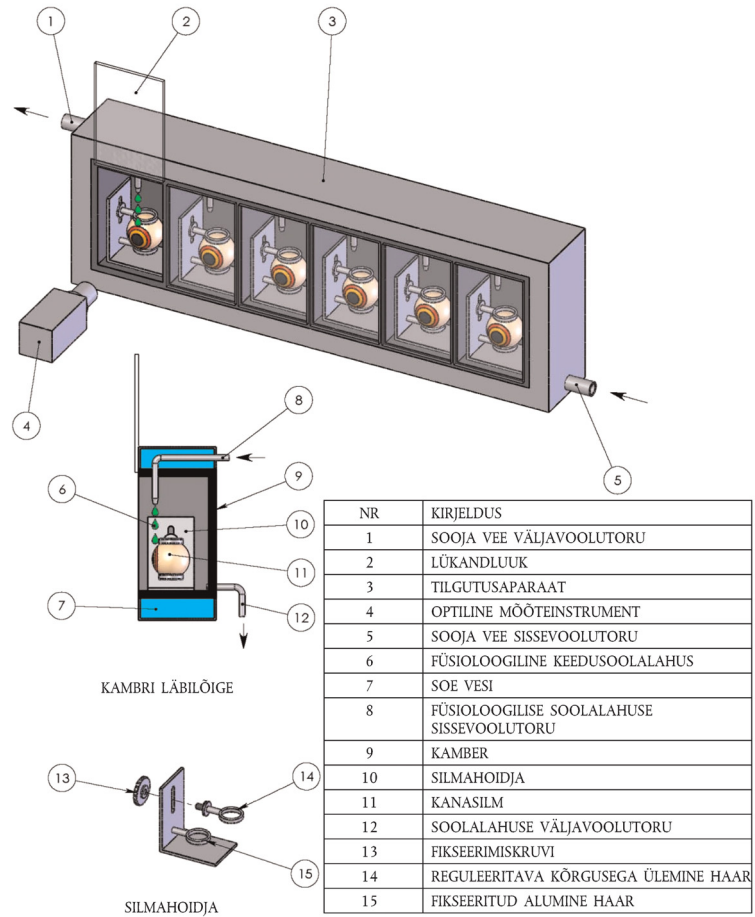
⁽³⁾ Vastavalt BCOP-katse ja ICE-katse tulemustele.

▼M2

3. liide

ICE-katses kasutatava tilgutusaparaadi ja silmahoidja skeem

(Tilgutusaparaadi ja silmahoidja üldise täiendava kirjelduse on esitanud Burton et al. (17))



▼ M3

B.49. *IN VITRO* IMETAJARAKKUDE MIKROTUUMA KATSE

SISSEJUHATUS

1. *In vitro* mikrotooma katse (*miconucleus*, MNvit) on genotoksilisuskatse, milles uuritakse mikrotoomade (MN) esinemist interfaasis olevate rakkude tsütöplasma. Mikrotoom võib tekkida atsentriilsel kromosoomifragmendist (st milles ei ole tsentromeeri) või tervest kromosoomist, mis ei suuda migreeruda pooluseni raku jagunemise anafaasietapil. Katsega määratakse klastogeensete ja aneugeensete kemikaalide (ainete ja segude) aktiivsus (1, 2) rakkudes, mis on uuritava ainega kokkupuute ajal või pärast seda jagunenud. Käesolev katsemeetod võimaldab kasutada nii aktiini polümerisatsiooni inhibiitori tsütöhalasiin B (tsütöB) kasutamisel põhinevaid katse-eeskirju kui ka selliseid, milles tsütöB-d ei kasutata. TsütöB lisamine enne valitud mitoosi võimaldab kindlaks teha ja selektiivselt analüüsida mikrotoomade esinemise sagedust rakkudes, mis on lõpetanud ühe mitoosi, kuna sellised rakud on kahetuumsed (3, 4). Käesolev katsemeetod võimaldab kasutada ka tsütokineesiblokiga katse-eeskirju, kui on tõendatud, et uuritud rakupopulatsioon on läbinud mitoosi.

2. Lisaks MNvit-katse kasutamisele mikrotoomi tekitavate kemikaalide (ainete või segude) kindlakstegemiseks võib teavet kromosoomikahjustuste ja mikrotoomade tekkimise kohta saada veel tsütokineesibloki, kinetokooride immunokeemilise märgistamisega või tsentromeeri/telomeerisondidega hübriidiseerimisega (fluorestants *in situ* hübriidatsiooni (FISH)) kasutamisega (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16). Märgistamist ja hübriidiseerimist võib kasutada, kui on tekkinud rohkesti mikrotoomi ja uurija tahab kindlaks teha, kas nende tekkimise põhjuseks on klastogeenne ja/või aneugeenne protsess.

3. Mikrotoomad kujutavad endast kahjustust, mis on edasi antud tütarakkudele, samal ajal kui metafaasis olevates rakkudes kogunenud kromosoomihälbeid edasi ei anta. Kuna interfaasis olevate rakkude mikrotoomi võib küllalt objektiivselt hinnata, peab katse tegija üksnes määrama, kas rakud on läbinud jagunemise või ei ole ning kui paljudes rakkudes on mikrotoom. Selle tulemusel saab preparaate hinnata suhteliselt kiiresti ja analüüsi saab automatiseerida. Seepärast tasub iga töötlemisega seoses hinnata tuhandeid rakke, mitte sadu; see suurendab katse tõhusust. Lõpuks, kuna mikrotoomad võivad tekkida mahajäänud kromosoomidest, avaneb võimalus kindlaks teha aneuploidsust tekitavaid mõjureid, mida on raske uurida tavaliste kromosoomihälbekatsetega, näiteks OECD katsejuhendiga 473 (käesoleva lisa peatükk B.10) (17). Kuid MNvit-katse ei võimalda eristada polüploidsust tekitavaid kemikaale klastogeensetest kemikaalidest, kui ei kasutata selliseid erimeetodeid nagu punktis 2 kirjeldatud FISH.

4. MNvit-katse on *in vitro* meetod, milles tavaliselt kasutatakse inimese või näriliste kultuuris kasvatatud rakke. Meetod võimaldab kromosoomikahjustuste tekitamise võimet igakülgset *in vitro* uurida, kuna sellega saab määrata nii aneugeene kui ka klastogeene.

5. MNvit-katse on töökindel ja tõhus paljude rakutüüpide puhul ja nii tsütöB juuresolekul kui ka puudumisel. MNvit-katse kehtivus on tõendatud paljude andmetega, mis on saadud näriliste mitme rakuliiniga (CHO, V79, CHL/IU ja L5178Y) ja inimese lümfotsüütidega (18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31). Need hõlmavad eelkõige rahvusvahelisi valideerimisuringuid, mida koordineeris Société Française de Toxicologie

▼ M3

Génétique (SFTG) (18, 19, 20, 21, 22), ja rahvusvahelise genotoksilisuse määramise rahvusvahelise seminari ettekandeid (4, 16). Euroopa Komisjoni alternatiivmeetodite valideerimise Euroopa keskus (ECVAM) on tõendite kaalukusel põhineva tagasihaarava valideerimisuuringuga olemasolevaid andmeid ka uuesti hinnanud ning katsemeetodi teaduslikku õigsust on toetanud ECVAMi teadusnõustajate komitee (ESAC) (32, 33, 34). On kirjeldatud inimese TK6-lümfoblastoidrakuliini (35), HepG2-rakkude (36, 37) ja primaarsete Süüria hamstri looterakkude (38) kasutamist, kuid valideerimisuuringutes neid ei kasutatud.

MÕISTED

6. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

ALGSED KAALUTLUSED

7. *In vitro* tehtavad katsed nõuavad üldjuhul välist metaboolse aktiveerimise allikat, kui rakud ei ole uuritavate kemikaalide suhtes metaboolselt kompetentsed. Väliste metaboolse aktiveerimise süsteem ei ole täielikult sarnane *in vivo* tingimustega. Tuleb hoolitseda, et välditaks valepositiivseid tulemusi põhjustavaid tingimusi, mis ei peegelda looduslikku mutageensust ja võivad tuleneda pH või osmolaalsuse suurtest muutustest või tsütotoksilisuse kõrge tasemest (39, 40, 41). Kui uuritav kemikaal tekitab lisamisel keskkonna pH muutuse, tuleb pH õigeks seada, eelistatult varulahusesse puhvri lisamisega, nii et kõik ruumalad kõikides katsetingimustes ja kõikide kontrollproovidega jääksid samaks.
8. Mikrotoomade tekkimise induktsiooni analüüsimiseks on väga tähtis, et mitoos oleks toimunud nii uuritava kemikaaliga töödeldud kultuurides kui ka töötlemata kultuurides. Kõige informatiivsem mikrotoomade tekke hindamise seisukohast on olukord, kus rakud on lõpetanud ühe mitoosi uuritava kemikaaliga töötlemise ajal või pärast seda.

KATSE PÕHIMÕTE

9. Inimpäritoluga või imetajast saadud rakukultuurid viiakse kokkupuutesse uuritava ainega nii metaboolse aktivatsiooni välise allika juuresolekul kui ka puudumisel, kui ei kasutata vajaliku metaboliseerimisvõimega rakke. Igas katses tehakse paralleelsed katsed ka lahusti/pealekandmisvahendi kontrolli ja positiivse kontrolli kemikaalidega.
10. Uuritava kemikaaliga kokkupuute ajal või pärast seda kasvatatakse rakke piisavalt kaua, et kromosoomi- või väärnakahjustus võiks viia mikrotoomade tekkimiseni interfasis olevates rakkudes. Aneuploidsuse tekitamiseks peaks uuritav aine tavaliselt olema mitoosi ajal juures. Kogutud ja värvitud interfasisrakke uuritakse mikrotoomade olemasolu kindlakstegemiseks. Ideaaljuhul tuleks mikrotoomad arvesse võtta üksnes sellistes rakkudes, mis on lõpetanud mitoosi kas uuritava ainega kokkupuute ajal või kokkupuutejärgse aja jooksul, kui seda kasutatakse. Tsütokineesiblokkeriga töödeldud kultuurides saavutatakse see ainult kahetuumsete rakkude arvessevõtmisega. Tsütokineesiblokkeri puudumise korral on oluline tõendada, et uuritud rakud tõenäoliselt läbisid raku jagunemise uuritava ainega kokkupuute ajal või pärast seda. Kõigi katse-eeskirjade puhul on oluline tõendada, et rakkude paljunemine on toimunud nii kontrollkultuurides kui ka uuritava ainega töödeldud kultuurides, ning vaja on hinnata ainest tingitud tsütotoksilisust või tsütostaasi kultuurides (või paralleelkultuurides), mida uuritakse mikrotoomade esinemise suhtes.

▼ **M3****KATSE KIRJELDUS***Ettevalmistused*

11. Võib kasutada primaarsete inimese perifeerse vere lümfotsüütide rakukultuuri (5, 19, 42, 43) ja mitmeid näriiliste rakuliine nagu CHO, V79, CHL/IU ja L5178Y (18, 19, 20, 21, 22, 25, 26, 27, 28, 30). Muude rakuliinide ja -tüüpide kasutamist tuleb põhjendada, nagu on kirjeldatud katse kehtivuse kriteeriumide punktis, tõendades, et katse annab nendega usaldusväärseid tulemusi. Kuna mikrotoomade esinemise taustsagedus mõjutab katse tundlikkust, soovitatakse kasutada rakutüüpe, millel mikrotoomade moodustumise taustsagedus on madal ja stabiilne.
12. Inimese perifeerse vere lümfotsüüdid tuleb saada noorelt (ligikaudu 18–35-aastaselt), tervelt mittesuitsetavalt isikult, kes teadaolevalt ei ole hiljuti genotoksiliste kemikaalide ega radiatsiooniga kokku puutunud. Kui eri doonoritelt kogutud rakud kasutamiseks ühendatakse, tuleb esitada doonorite arv. Mikrotoomade esinemise sagedus suureneb vanusega; see tendents on märgatavam naiste kui meeste puhul (44) ning seda tuleks ühendatavate doonorirakkude valimisel arvesse võtta.

Kasvukeskkonnad ja kultiveerimistingimused

13. Rakukultuuride säilitamiseks tuleks kasutada sobivat kasvukeskkonda ja inkubeerimistingimusi (kasvunõud, CO₂ kontsentratsioon, temperatuur ja niiskus). Püsivaid rakuliine ja -tüvesid tuleb korrapäraselt kontrollida modaalse kromosoomiarvu stabiilsuse ning mükoplasma saastumise puudumise suhtes; ei tohiks kasutada rakuliine või -tüvesid, mis on saastunud või mille modaalne kromosoomide arv on muutunud. Kasutatavate rakkude normaalse rakutsükli kestus katselabori kasvutingimustes peaks olema teada. Kui kasutatakse blokeeritud tsütokineesi meetodit, tuleb tsütokineesi inhibiitori kontsentratsioon konkreetse rakutüübi jaoks optimeerida ja näidata, et see annab hindamiseks vajalike kahetuumsete rakkude hea saagise.

Kultuuride ettevalmistamine

14. Püsivad rakuliinid ja -tüved: rakud paljundatakse tüvikultuuridest, mis on külvatud kasvukeskkonda sellise tihedusega, et rakukultuur ei jõua monokihi puhul söödett täielikult katta enne kogumisaega ning suspensioonkultuuri puhul ei muutu liiga tihedaks, ja inkubeeritakse 37 °C juures.
15. Lümfotsüüdid: antikoagulandiga (näiteks hepariiniga) töödeldud täisverd või eraldatud lümfotsüüte kasvatatakse enne uuritava aine ja tsütob-ga kokku puudet mitogeeni, näiteks fütõhemaglutiniini juuresolekul.

Metaboolne aktivatsioon

16. Kui kasutatakse puuduliku endogeense metabolismivõimega rakke, tuleks kasutada välist metaboliseerivat süsteemi. Enimkasutatav süsteem on näriiliste ensüüme indutseerivate ainete, nt Aroclor 1254-ga (45, 46) või fenobarbitooni ja β-naftoflavooni (46, 47, 48, 49), töödeldud maksa postmitokondriaalne fraktsioon (S9), mida on täiendatud kofaktoritega. Fenobarbitooni ja β-naftoflavooni kasutamine ei ole vastuolus püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsiooniga (50) ega määrusega (EÜ) nr 850/2004 (püsivate orgaaniliste saasteainete kohta) (66) ning on tõendatud, et see on segafunktsiooniga oksüdaaside indutseerimisel sama tõhus kui Aroclor 1254 (46, 47, 48, 49). Postmitokondriaalset fraktsiooni kasutatakse tavaliselt kontsentratsioonis 1–10 mahuprotsenti lõplikus katsekeskkonnas. Metaboolse aktivatsiooni süsteemi tingimuste valik võib sõltuda uuritava aine keemilisest aineklassist ja mõnel juhul võib olla sobiv kasutada rohkem kui ühte S9 kontsentratsiooni.

▼ **M3**

17. Katse tegemiseks võib kasutada geneetiliselt muundatud rakuliine, milles töötavad konkreetsed inimese või närilise aktiveerivad ensüümid; sel juhul ei ole välist metaboolse aktivatsiooni süsteemi vaja. Sel juhul peab rakuliini valik olema teaduslikult põhjendatud, näiteks sellega, et segafunktsiooniga oksüdaasid on seotud uuritava aine metabolismiga (51) ja on tundlikud teadaolevate klastogeenide ja aneugeenide toime suhtes (vt katse kehtivuse kriteeriume käsitlev punkt). Tuleb endale aru anda, et rakus töötav(ad) segafunktsiooniga oksüdaas(id) ei tarvitse uuritavat ainet metaboliseerida; sellisel juhul katse negatiivne tulemus ei tõenda, et uuritav aine ei suuda tekitada mikrotuumi.

Uuritava aine ettevalmistamine

18. Tahke uuritav aine tuleb lahustada sobivas lahustis või kandeaines ja vajaduse korral lahjendada enne rakkude töötlemist. Vedelat kemikaali võib lisada otse katesüsteemi ja/või lahjendada enne töötlemist. Gaasi või lenduva kemikaali uurimiseks tuleks tavalist katse-eeskirja sobivalt muuta, näiteks töödelda suletud anumad (52, 53). Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

Katse tingimused

Lahusti/kandeaine

19. Lahusti/kandeaine ei tohiks uuritava ainega reageerida ega kasutatavas kontsentratsioonis oluliselt kahjustada rakkude eluvõimet või S9 aktiivsust. Kui kasutatakse muid aineid peale tunnustatud lahustite/kandainete (vesi, raku-kultuuri kasvukeskkond, dimetüülsulfoksiid), tuleb esitada tõendavad andmed, et aine sobib uuritava ainega kasutamiseks ega ole genotoksiline. Soovitav on võimaluse korral alati kõigepealt kaaluda vee kui lahusti/kandeaine kasutamist.

Tsütob kui tsütokineesi blokeerija kasutamine

20. Üks olulisemaid asju MNvit-katse tegemisel on tagada, et loendatud rakud oleksid uuritava ainega töötlemise või töötlemisjärgse inkubeerimise ajal (kui rakke pärast töötlemist inkubeeritakse) lõpetanud mitoosi. Tsütokineesi blokeerimiseks on kõige rohkem kasutatud tsütob-d, kuna see inhibeerib aktiini polümerisatsiooni, hoiab sellega ära tütarakkude eraldumise pärast mitoosi, mille tagajärjel tekivad kahetuumsed rakud (5, 54, 55). Mikrotuumade loendamise saab seepärast piirata üksnes selliste rakkudega, mis on töötlemise ajal või pärast seda läbinud mitoosi. Samal ajal võib mõta uuritava aine mõju raku paljunemise kineetikale. Kui kasutatakse inimese lümfotsüüte, tuleks tsütokineesi blokeerimiseks kasutada tsütob-d, kuna tsükli aeg sõltub kultuurist ja doonorist ning kuna fütöhemaglutiniin ei toimi kõikidele lümfotsüütidele. Rakuliinide katsetamisel on kasutatud ka muid meetodeid, et teha kindlaks, kas loendatavad rakud on jagunenud; neid meetodeid on käsitletud punktis 26.

21. Labor peaks iga rakutüübi jaoks määrama tsütob sobiva kontsentratsiooni, et saavutada lahusti/kandeaine kontrollkultuuris kahetuumsete rakkude optimaalne sagedus. Tsütob sobiv kontsentratsioon on tavaliselt vahemikus 3–6 µg/ml.

▼ M3

- Rakkude paljunemise ja tsütotoksilisuse mõõtmine ning kokkupuutekontsentratsiooni valimine
22. Katsetes kasutatava uuritava aine suurima kontsentratsiooni kindlaksmääramisel tuleks vältida kontsentratsioone, mis võivad tekitada kunstlikult positiivseid tulemusi, näiteks kontsentratsioone, mis on liiga tsütotoksilised, põhjustavad sadenemist kasvukeskkonnas ja pH või osmolaalsuse olulist muutust (39, 40, 41).
 23. Rakkude paljunemise mõõtmisega tõendatakse, et töödeldud rakud on katse ajal läbinud mitoosi ja et töötlust tehakse lubatava tsütotoksilisustaseme juures (vt punkt 29). Metaboolset aktivatsiooni vajavate rakkude puhul tuleks tsütotoksilisus määrata metaboolse aktivatsiooniga ja ilma aktivatsioonita, kasutades rakkude arvukuse suhtelist suurenemist (*relative increase in cell counts*, RICC) või suhtelist rakupopulatsiooni kahekordistumist (*relative population doubling*, RPD) (vt võrrandid, 2. liide), kui ei kasutata tsütoB-d. TsütoB kasutamise korral võib tsütotoksilisuse määrata replikatsiooniindeksi (*replication index*, RI) abil (vt võrrand, 2. liide).
 24. Rakukultuuride töötlemine tsütoB-ga ning ühe-, kahe- ja paljutumsete rakkude suhtelise esinemissageduse määramine kultuuris on täpne meetod, millega saab mõõta rakkude töötlemise mõju rakkude paljunemisele, samuti töötlemise tsütotoksilist või tsütostaatilist mõju (5), ja tagada, et loendatakse ainult töötlemise ajal või pärast seda jagunenud rakke.
 25. TsütoB-ga tehtavates katsetes saab tsütostaasi/tsütotoksilisust mõõta tsütokineesi blokiga paljunemise indeksi (*cytokinesis-block proliferation index*, CBPI) järgi (5, 26, 56) või tuletada selle näitaja kultuuri vähemalt 500 raku replikatsiooniindeksist (RI) (vt võrrand, 2. liide). Kui rakkude paljunemise hindamiseks kasutatakse tsütoB-d, tuleks CBPI või RI määrata vähemalt 500 rakust kultuuri kohta. Selliseid mõõtmisi võib töödeldud ja kontrollkultuuri võrdlemise abil muu hulgas kasutada tsütotoksilisuse hindamiseks. Muude tsütotoksilisuse näitajate (näiteks pinna katmine, rakkude arvu, apoptoosi, nekroosi ja metafasi loendamine) hindamine võib anda kasulikku teavet.
 26. Ilma tsütoB-ta tehtavates katsetes on vaja tõendada, et kultuuris loendatavad rakud on läbinud raku jagunemise uuritava ainega kokkupuute ajal või pärast seda, muidu võidakse saada valenegatiivne tulemus. Üksnes jagunenud rakkude loendamise tagamiseks on kasutatud selliseid meetodeid nagu bromodesoksüüridiini (BrdU) viimine rakkudesse ja järgnev määramine, et kindlaks teha replitseerunud rakud (57), kloonide moodustamine, kui püsivate rakuliinide rakke töödeldakse ja loendatakse kohapeal mikroskoobipreparaadis (paljunemisindeks, PI) (25, 26, 27, 28), rakupopulatsiooni suhtelise kahekordistumise (RPD) või rakkude arvukuse suhtelise suurenemise (RICC) mõõtmine või muud usaldusväärsed meetodid (16, 56, 58, 59) (vt võrrandid, 2. liide). Muude tsütotoksilisuse või tsütostaasi näitajate (näiteks pinna katmine, rakkude arvu, apoptoosi, nekroosi ja metafasi loendamine) hindamine võib anda kasulikku teavet.
 27. Tuleks hinnata vähemalt kolme analüüsitava kontsentratsiooni. Selle saavutamiseks võib olla tarvis teha katseid suure arvu lähedaste kontsentratsioonidega ja määrata mikrotuuma moodustumine sellistel kontsentratsioonidel, mille tsütotoksilisus on lubatavas vahemikus. Teine võimalus on teha eelnev tsütotoksilisuse katse, et piirata otsustava katse kontsentratsioonivahemikku.
 28. Suurima kontsentratsiooni tsütotoksilisus peaks olema 55 ± 5 %. Suuremal kontsentratsioonil võivad kromosoomikahjustused tekkida tsütotoksilisuse kõrvalnähtuna (60). Tsütotoksilisuse esinemise korral peaksid katse tegemiseks valitud kontsentratsioonid katma vahemiku 55 ± 5 % tsütotoksilisuse tekitamisest kuni vähese või puuduva tsütotoksilisuseni.

▼M3

29. Kui tsütotoksilisust ega sadenemist ei esine, peaks suurim katses kasutatav kontsentratsioon olema 0,01 M, 5 mg/ml või 5 µl/ml, olenevalt sellest, mis on kõige väiksem. Analüüsiks valitud kontsentratsioonid ei tohiks üldiselt olla suuremate vahedega kui 10 korda. Järsu kontsentratsiooni-mõju sõltuvusega uuritava aine puhul võib olla vajalik kasutada väiksemat uuritava aine kontsentratsioonide vahet, et loendada kultuure ka mõõduka või vähesel toksilisuse vahemikus.

30. Kui piiravaks teguriks on lahustuvus, peaks suurim uuritav kontsentratsioon olema selline, mille juures kultuuris on näha väga nõrka sadet, kui see ei takista loendamist ja kui piiravaks ei muutu tsütotoksilisus. Sadenemist tuleks hinnata selliste meetoditega nagu valgusmikroskoopia, märkides ära püsima jääva või rakkude kasvatamise ajal (töötlemise lõpuks) tekkiva sademe.

Kontrollkatsed

31. Igas uuringus kasutatakse paralleelseid positiivseid ja lahusti/kandeaaine kontrollkatseid metaboolse aktivatsiooniga ja ilma selleta.

32. Positiivne kontroll on vajalik selle tõendamiseks, et kasutatavad rakud ja katse-eeskiri võimaldavad teha kindlaks klastogeene ja aneugeene ning kinnitada S9 valmistise metabolismivõimet. Positiivse kontrolli katses tuleks kasutada teadaolevaid mikrotooma moodustumist põhjustavaid aineid sellisel kontsentratsioonil, mis põhjustab taustaga võrreldes väikese, kuid korratava mikrotooma esinemissageduse suurenemise ja tõendab katseüsteemi tundlikkust. Positiivse kontrolli kemikaali kontsentratsioon valitakse nii, et mõju oleks selge, kuid et loendaja kohe ei taipaks, millised kodeeritud mikroskoobipreparaatidest on positiivse kontrolli katsed.

33. Tuleks kasutada metaboolset aktivatsiooni vajavat klastogeeni (näiteks tsüklofosfamid, benso[a]püreen), kuna nii on võimalik tõendada katseüsteemi metaboolset kompetentsust ja suutlikkust teha kindlaks klastogeene. Kasutada võib ka muid positiivse kontrolli kemikaale, kui see on õigustatud. Kuna mõni metaboolset aktivatsiooni vajav positiivse kontrolli kemikaal võib teatud töötlemistingimustes või teatava rakuliini puhul olla aktiivne ilma välise metaboolse aktivatsioonita, on valitud rakuliini ja kontsentratsiooni puhul vaja kontrollida metaboolse aktivatsiooni vajalikkust ja S9 valmistise aktiivsust.

34. Praegu ei teata ühtegi aneugeeni, mille genotoksilisuse avaldamiseks oleks vaja metaboolset aktivatsiooni (16). Praegu on aneugeense aktiivsuse positiivse kontrolli kemikaalideks tunnustatud näiteks kolhitsiin ja vinblastiin. Võib kasutada muid kemikaale, kui need tekitavad mikrotoomi kas üksnes või peamiselt aneugeense toime kaudu. Kahe positiivse kontrolli (klastogeensuse ja aneugeensuse kontroll) vajaduse vältimiseks ilma metaboolse aktivatsioonita võib aneugeensuse kontrolli kasutada positiivse kontrollina ilma S9-ta ja klastogeensuse kontrolli võib kasutada selleks, et kontrollida kasutatud metaboolse aktivatsiooni süsteemi adekvaatsust. S9 juuresolekut mittevajavate rakkude puhul tuleb kasutada nii klastogeensuse kui ka aneugeensuse positiivset kontrolli. Soovitavad positiivse kontrolli kemikaalid on 3. liites.

35. Võib kaaluda samasse keemiliste ainete klassi kuuluva positiivse kontrolli kemikaali kasutamist, kui sobiv aine on kättesaadav. Kõik kasutatud positiivse kontrolli kemikaalid peaksid sobima rakutüübile ja aktivatsiooniingimustele.

▼ **M3**

36. Lahusti/kandaine kontrollkatsed tuleb teha kultuuri iga kogumisaja jaoks. Lisaks tuleb kasutada ka töötlemata negatiivset kontrolli (ei sisalda lahustit/kandainet), kui avaldatud andmete või labori varasemate kontrollikatsetega ei ole tõendatud, et valitud lahustil ei ole kasutatava kontsentratsiooni juures kahjulikku ega genotoksilist mõju.

KATSE KÄIK*Töötlemiskava*

37. Selleks et suurendada konkreetsel rakutsükli etapil toimiva aneugeeni või klastogeeni kindlakstegemise tõenäosust, on väga oluline, et uuritava ainega töödeldaks piisavalt palju rakke nende rakutsükli igal etapil. Rakuliinide ja primaarsete rakkude kultuuride töötlemise kava võib seepärast mõnevõrra erineda kavast, mida kasutatakse lümfotsüütide puhul, mille rakutsükli alustamiseks on vaja mitogeenset stimulatsiooni, vt lähemalt punktid 41–43 (16).
38. Teoreetilistest kaalutlustest ja avaldatud andmetest (18) tuleneb, et enamiku aneugeeni ja klastogeeni võib kindlaks teha lühiajalise töötlemisega (3–6 tundi) S9 juuresolekul ja puudumisel, millele järgneb uuritava aine eemaldamine ja rakkude kasvatamine 1,5 kuni 2,0 rakutsükli jooksul (6). Rakud kogutakse kas siis, kui töötlemise algusest on möödunud ajavahemik, mis vastab umbes 1,5–2,0 rakutsüklile normaalsete (see tähendab töötlemata) rakkude puhul, või töötlemise lõpus (vt tabel 1). Proovide võtmise või kogumise aega võib pikendada, kui on teada või võib oletada, et uuritav aine mõjutab rakutsükli pikkust (näiteks nukleosiidianaloogide puhul).
39. Kuna S9 valmistis võib kultuuris kasvatatava imetajaraku jaoks olla toksiline, kasutatakse pikendatud kokkupuuteajaga (1,5–2,0 normaalse rakutsükli kestust) töötlemist üksnes S9 puudumisel. Pikendatud töötlemisaja puhul võib valida, kas töödelda rakke uuritava kemikaaliga tsütoB puudumisel või juuresolekul. Need valikvariandid on ette nähtud olukorra jaoks, kus võib karta, et uuritav aine ja tsütoB mõjutavad teineteist.
40. Pakutavad rakkude töötlemise kavad on esitatud tabelis 1. Esitatud üldisi töötlemiskavu võib muuta, et võtta arvesse uuritava aine stabiilsust või reaktsioonivõimet või kasutatavate rakkude konkreetseid kasvunäitajaid. Töötlemine peab alati algama ja lõppema rakkude eksponentsiaalse kasvu ajal. Töötlemiskavu on täpsemalt kirjeldatud punktides 41–47.

*Tabel 1***Rakkude töötlemise ja kogumise ajad MNvit-katse puhul**

Lümfotsüüdid, primaarsed rakud ja rakuliinid, mida töödeldakse tsütoB lisamisega	+ S9	Töödeldakse 3–6 tundi S9 juuresolekul; eemaldatakse S9 ja töötlemiskeskond; lisatakse uus kasvukeskkond ja tsütoB; rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.
	– S9 Lühiajaline kokkupuude	Töödeldakse 3–6 tundi; eemaldatakse töötlemiskeskond; lisatakse uus kasvukeskkond ja tsütoB; rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.

▼ M3

	– S9 Pikendatud puude	kokku-	<p><i>Variant A:</i> töödeldakse tsütoB juuresolekul 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja jooksul; rakud kogutakse kokkupuuteaja lõpus.</p> <p><i>Variant B:</i> töödeldakse 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja jooksul;</p> <p>eemaldatakse uuritava aine;</p> <p>lisatakse uus kasvukeskkond ja tsütoB;</p> <p>rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.</p>
--	-----------------------------	--------	--

Rakuliinid, mida töödeldakse tsütoB lisamiseta

(Kõik toimub eespool esitatud kavade kohaselt, ainult tsütoB-d ei lisata.)

Lümfotsüüdid, primaarsed rakud ja rakuliinid, mida töödeldakse tsütoB lisamisega

41. Kõige tõhusam lähenemisviis lümfotsüütide puhul on alustada uuritava ainega kokkupuudet pärast 44–48 tunni möödumist fütohemaglutiniiniga stimuleerimisest, kui tsükli sünkronisatsioon on kadunud (5). Esialgses katses töödeldakse rakke 3–6 tundi uuritava ainega S9 puudumisel ja juuresolekul. Töötlemiskeskond eemaldatakse ja asendatakse värsket kasvukeskkonnaga, mis sisaldab tsütoB-d, ning rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.

42. Kui mõlemad esialgsed lühiajalise töötlemise (3–6 tundi) katsed annavad negatiivse või ebaselge tulemuse, kasutatakse järgnevat pikendatud töötlemis- või kokkupuuteaega ilma S9-ta. Kasutada võib kahte töötlemise varianti, mis on võrdselt lubatavad. Stimuleeritud lümfotsüütide puhul on siiski vahet sobivam kasutada varianti A, kuna eksponentsiaalne kasv võib 96 tundi pärast stimuleerimist olla juba vähenemas. Variandi B puhul ei tohiks rakukultuurid lõpliku kogumise ajaks jõuda pinna kinnikatmiseni.

— Variant A: rakke töödeldakse uuritava ainega 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja jooksul ja kogutakse töötlemisaja lõpus.

— Variant B: rakke töödeldakse uuritava ainega 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja jooksul. Töötlemiskeskond eemaldatakse ja asendatakse värsket kasvukeskkonnaga ning rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.

43. Primaarseid rakke ja rakuliine tuleks töödelda samuti kui lümfotsüüte, kuid esimesi ei ole vaja stimuleerida 44–48 tundi fütohemaglutiniiniga. Muid rakke kui lümfotsüüte tuleks töödelda uuritava ainega nii, et katse lõpetamise ajal on rakud ikka veel logaritmilises kasvufaasis.

Rakuliinid, mida töödeldakse ilma tsütoB lisamiseta

44. Rakke tuleks töödelda 3–6 tunni jooksul S9 juuresolekul ja puudumisel. Töötlemiskeskond eemaldatakse ja asendatakse värsket kasvukeskkonnaga ning rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.

▼ **M3**

45. Kui mõlemad esialgsed lühiajalise töötlemise (3–6 tundi) katsed annavad negatiivse või ebaselge tulemuse, kasutatakse järgnevat pikendatud töötlemis- või kokkupuuteaega (ilma S9-ta). Kasutada võib kahte töötlemise varianti, mis on võrdselt lubatavad:

— variant A: rakke töödeldakse uuritava ainega 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja jooksul ja kogutakse töötlemisaja lõpus;

— variant B: rakke töödeldakse uuritava ainega 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja jooksul. Töötlemiskeskond eemaldatakse ja asendatakse värske kasvukeskkonnaga ning rakud kogutakse pärast 1,5–2,0 normaalse rakutsükliaja möödumist.

46. Monokihtides võib pärast 3–6-tunnise töötlemise lõppu olla mitoosifaasi rakke (mida võib ära tunda selle järgi, et need on ümmargused ja tulevad pinna küljest lahti). Kuna mitoosifaasis rakud tulevad kergesti lahti, võivad need uuritavat ainet sisaldava keskkonna eemaldamisel minna kaotsi. Need tuleb kultuuri pesemisel kokku koguda ja kultuuri tagasi panna, et vältida mitoosifaasi jõudnud ja võimalikke mikrotoomi sisaldavate rakkude kaotamine kogumise ajal.

Rakukultuuride arv

47. Uuritava aine iga kontsentratsiooni juures, samuti lahusti/kandeaine kontrolli ja negatiivse kontrolli puhul, tuleks alati kasutada kaht paralleelkultuuri. Kui labori varasemad andmed näitavad, et paralleelkultuuride erinevus on väike, võib olla vastuvõetav ühe kultuuri kasutamine. Üksikkultuuride kasutamisel tuleks kasutada suuremat arvu kontsentratsioone.

Rakkude kogumine ja mikroskoobipreparaadi ettevalmistamine

48. Iga rakukultuur kogutakse ja töödeldakse eraldi. Rakkude ettevalmistamine võib hõlmata hüpotoonilist töötlust, kuid see etapp ei ole vajalik, kui vajalik rakkude laotus saadakse muul viisil. Mikroskoobipreparaadi ettevalmistamiseks võib kasutada mitmesuguseid meetodeid, kui on saadud kvaliteetsed, loendamiseks sobivad rakkude valmistised. Säilitada tuleks rakkude tsütöplasma, et oleks võimalik määrata mikrotoomi ja (blokeeritud tsütokineesi meetodi puhul) usaldusväärselt kindlaks teha kahetuumseid rakke.

49. Mikroskoobipreparaate võib värvida mitme meetodiga, nagu näiteks Giemsa meetodiga või fluorestseerivate DNA-spetsiifiliste värvainetega (59). DNA-spetsiifilise värvaine kasutamine (nt akridiinoranž (61) või Hoechst 33258 + püroniin-Y (62)) võib kõrvaldada mõne muude kui DNA-spetsiifiliste värvainete kasutamisega seotud artefakti. Kui soovitakse saada teavet mikrotoomade moodustumise mehhanismi kohta, võib mikrotoomade sisalduse (kromosoom/kromosoomifragment) kindlakstegemiseks kasutada kinetokoorivastaseid antikehi, fluoretsi *in situ* hübriidatsiooniga (FISH) pantsentromeersete DNA-sondidega või praimitud *in situ* märgistamist pantsentromeerispetsiifilise praimeriga koos DNA sobiva vastandvärvimisega. Klastogeenide ja aneugeenide eristamiseks võib kasutada muid meetodeid, mille kohta on tõendatud, et need on tõhusad.

Analüüs

50. Kõik mikroskoobipreparaadid, sh lahusti/kandeaine ning positiivse ja negatiivse kontrolli omad, kodeeritakse sõltumatult enne mikroskoopilist analüüsi. Kodeeritud proovide analüüsimiseks võib kasutada ka valideeritud automaatseid voolutsütomeetria või kujutise analüüsi süsteeme.

▼ M3

51. TsütoB-ga töödeldud kultuuride puhul tuleks mikrotoomade sagedust analüüsida vähemalt 2 000 kahetuumses rakus iga kontsentratsiooni kohta (vähemalt 1 000 kahetuumses rakus iga kultuuri kohta; kaks kultuuri igal kontsentratsioonil). Üheainsa kultuuri kasutamisel tuleks kõnealuse kultuuri kohta loendada vähemalt 2 000 kahetuumset rakku igal kontsentratsioonil. Kui igal kontsentratsioonil on loendamiseks kättesaadav oluliselt vähem kui 1 000 kahetuumset rakku või üheainsa kultuuri kasutamisel 2 000 rakku ja kui olulist mikrotoomade esinemissageduse suurenemist ei täheldata, tuleb katset korrata suurema rakkude arvuga või vähem mürgise kontsentratsiooniga, olenevalt sellest, kumb on sobivam. Tuleks jälgida, et ei loendataks ebakorrapärase kujuga kahetuumseid rakke või rakke, mille kaks tuuma on oluliselt erineva suurusega; samuti ei tohiks kahetuumseid rakke segi ajada halvasti eraldunud paljutuumsete rakkudega. Rakke, mis sisaldavad rohkem kui kahte peamist tuuma, ei tuleks mikrotoomade loendamisel arvesse võtta, kuna sellistes rakkudes võib mikrotoomade esinemise taustsagedus olla suurem (63, 64). Ühetuumsete rakkude loendamine võib olla lubatav, kui on näidatud, et uuritav aine segab tsütoB toimet.
52. TsütoB-ga töötlemata kultuuride puhul tuleks mikrotoomade sagedust analüüsida vähemalt 2 000 rakus iga kontsentratsiooni kohta (vähemalt 1 000 rakus iga kultuuri kohta; kaks kultuuri igal kontsentratsioonil). Kui kasutatakse ühtainukest kultuuri igal kontsentratsioonil, tuleks kõnealusest kultuurist loendada vähemalt 2 000 rakku.
53. Kui kasutatakse tsütoB-d, tuleks määrata tsütokineesi blokiga paljunemise indeks (CBPI) või replikatsiooniindeks (RI) (vt 2. liide), kasutades vähemalt 500 rakku kultuuri kohta. Kui töötlemine toimub ilma tsütoB juuresolekuta, on oluline tõendada, et loendatud rakud on paljunenud (vt punktid 24–27).

Katse kehtivuse kriteeriumid

54. Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud MNvit-katse kasutamist kavandav labor peaks tõendama, et suudab usaldusväärselt ja õigesti määrata teadaoleva aneugeense või klastogeense mõjuga kemikaale koos metaboolse aktiivsiooniga ja ilma selleta, samuti teadaolevalt ilma sellise toimeta kemikaale, kasutades 3. liites esitatud võrdluskemikaale. Tõendina oma suutlikkusest käesolevat katsemeetodit korralikult rakendada peaks labor esitama tõendid, et mikrotoomade moodustumise seisukohast loendatavad rakud on läbinud ühe rakujagunemise, kui katse tehakse ilma tsütoB kasutamiseta.
55. Võrdluskemikaalidena soovitatakse kasutada 3. liites esitatud kemikaale. Võib kasutada ka asendavaid või täiendavaid kemikaale, kui nende toime on teada ja need tekitavad mikrotoomi sama toimemehhanismi kaudu ning on näidatud, et need on asjakohased MNvit-eeskirja järgi uuritavate kemikaalide puhul. Põhjendus võiks hõlmata paljude erinevate ainetega tehtud valideerimisuuringut või valideerimisuuringut, mis on suunatud kitsamale aineteringile, mis on seotud uuritava aine kemikaaliklassiga või uuritava kahjustusmehhanismiga.
56. Lahusti/kandaine kontrollid ja töötlemata kultuurid peaksid andma reproduitseeritavalt madalad ja kooskõlalised mikrotoomade tekke sagedused (punktis 11 nimetatud rakutüüpide puhul tavaliselt 5–25 mikrotooma 1 000 raku kohta). Muul rakutüübil võib olla teistsugune tulemustevahemik, mis tuleks kindlaks teha, kui rakutüüpi valideeritakse MNvit-katse kasutamiseks. Negatiivse kontrolli, lahusti ja positiivse kontrolli andmeid tuleks kasutada varasematel andmetel põhinevate kontrollvahemike kindlakstelemiseks. Osutatud väärtusi tuleks kasutada selleks, et otsustada, kas katse paralleelsed negatiivse ja positiivse kontrolli tulemused on adekvaatsed.

▼M3

57. Kui katse-eeskirjas tehakse väike muudatus (näiteks kasutatakse automaatset loendamist käsitsi loendamise meetodite asemel, kasutatakse uut rakutüüpi), tuleks enne muudetud katse-eeskirja lubatavaks lugemist tõendada, et ka muudetud katse on tõhus. Tõhususe tõendamiseks tuleb muu hulgas tõendada, et on võimalik kindlaks teha peamisi kromosoomide katkemise, lisandumise või kaotsimineku mehhanisme ja et on võimalik saada sobivad positiivse ja negatiivse kontrolli tulemused üksiku uuritava aine kemikaalklassi või paljude uuritavate ainete puhul.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste käsitlemine

58. Kui kasutatakse tsütokineesibloki meetodit, võetakse mikrotoumade hindamisel arvesse ainult kahetuumsetes rakkudes leitud mikrotoumade esinemise sagedust (sõltumatult mikrotoumade arvust ühe raku kohta). Ühe või kahe mikrotoumaga või suurema mikrotoumade arvuga rakkude arvu loendamine võib anda kasulikku teavet, kuid ei ole kohustuslik.
59. Paralleelselt tuleks mõõta kõikide töödeldud kultuuride ja lahusti/kandeaine kontrollikultuuride juures avalduv tsütotoksiline ja/või tsütostaatiline mõju (58). Kui kasutatakse tsütokineesi bloki meetodit, tuleks rakutsükli hilinemise mõõtmise järgi arvutada kõikide töödeldud ja kontrollikultuuride puhul tsütokineesi blokiga paljunemise indeks (CBPI) ja replikatsiooniindeks (RI). Tsütob puudumise korral tuleks kasutada kas RPDd, RICCi või PId (vt 2. liide).
60. Tulemused esitatakse iga üksiku kultuuri kohta. Lisaks esitatakse kokkuvõtte kõikidest tulemustest tabeli kujul.
61. Mikrotoumade tekkimist MNvit-katses võivad kemikaalid põhjustada sellega, et nende tõttu kromosoomid katkevad, lähevad kaotsi või esinevad mõlemad variandid korraga. Võib kasutada kinetokoorivastaseid antikehi, tsentromeerispetsiifilisi *in situ* sonde või muid meetodeid, et määrata kindlaks, kas mikrotoumade tekkemehhanism on seotud klastogeense ja/või aneugeense toimega.

Tulemuste hindamine ja tõlgendamine

62. Selget positiivset või negatiivset vastust ei ole vaja täiendava katsega kontrollida. Ebamäärast tulemust võib selgitada veel 1 000 raku vaatlemisega kõikidest kultuuridest, et vältida kultuuride kodeerimise mõttetuks muutumist. Kui see lähenemisviis ei võimalda tulemust selgitada, tuleks teha edasisi katseid. Järelkatsete tegemisel tuleks kaaluda katse parameetrite muutmist laiendatud või kitsamaks muudetud katsetingimuste vahemikus. Katse parameetrid, mida võidakse muuta, hõlmavad kasutatavate kontsentratsioonide jaotust, töötlemise ja rakkude kogumise ajastust ja/või metaboolse aktiveerimise tingimusi.
63. Positiivse tulemuse määramiseks on mitmeid kriteeriume, näiteks mikrotoumi sisaldavate rakkude arvu kontsentratsioonist sõltuv suurenemine või statistiliselt oluline suurenemine. Esmalt tuleks arvesse võtta tulemuste bioloogilist tähtsust. Vastuse bioloogilise olulisuse hindamisel võib juhinduda sellest, kas leitud väärtused on varasemate kontrollkatsete vahemikus või väljaspool seda vahemikku. Katsetulemuste hindamisel võib abivahendina kasutada sobivaid statistilisi meetodeid (65). Kuid statistiliste katsete tulemusi tuleks hinnata, võttes arvesse saadava tulemuse sõltuvust annusest. Samuti tuleks arvesse võtta reprodutseeritavust ja varasemaid andmeid.

▼ **M3**

64. Kuigi enamik katseid annab selge positiivse või negatiivse tulemuse, ei ole mõnel harval juhul võimalik andmete alusel teha kindlat otsust uuritava aine mõju kohta. Tulemused võivad jääda ebaselgeks või küsitavaks, olenemata sellest, kui palju katset korratakse.
65. MNvit-katse positiivne tulemus näitab, et uuritav aine tekitab imetajarakude kultuuris kromosoomide katkemist või kadu. Negatiivne tulemus näitab, et konkreetses katsetingimustes ei põhjusta uuritav aine imetajarakude kultuuris kromosoomide katkemist ega/või lisandumist või kadu.

Katseprotokoll

66. Katseprotokollis tuleks esitada vähemalt järgmine teave, kui see on uuringu läbiviimise seisukohast asjakohane.

Uuritav kemikaal

- Identifitseerimisandmed, Chemical Abstract Services Registry ehk CASi nr ja EÜ nr;
- füüsikaline olek ja puhtus;
- uuringu tegemisel olulised füüsikalise-keemilised omadused;
- uuritava aine võime reageerida lahusti/kandainega või rakukultuuri keskkonnaga.

Lahusti/kandaine

- Lahusti/kandaine valiku põhjendus;
- uuritava aine lahustuvus ja püsivus lahustis/kandaines.

Rakud

- Kasutatud rakkude tüüp ja päritolu;
- kasutatud rakutüübi sobivus;
- mükoplasma puudumine, vajaduse korral;
- teave rakutsükli pikkuse kohta, pooldumisaeg või paljunemisindeks;
- lümfotsüütide kasutamise korral veredoonorite arv, sugu ja vanus, vajaduse korral;
- lümfotsüütide kasutamise korral näidatakse, kas uuritava ainega viidi kokkupuutesse kogu veri või eraldatud lümfotsüüdid;
- ümberkülvide arv, vajaduse korral;
- rakukultuuri säilitamise meetodid, vajaduse korral;
- kromosoomide modaalarv;
- normaalse (negatiivse kontrolli) rakutsükli kestus.

Katsetingimused

- Tsütokineesi blokeeriv aine (nt tsütöB), kui seda kasutatakse, selle kontsentratsioon ja rakkude selle ainega kokkupuute kestus;
- kontsentratsioonide ja rakukultuuride arvu valimise põhimõtted, sh nt tsütotoksilisuse andmed ja lahustuvuse piirangud, kui need on olemas;
- kasvukeskkonna koostis, CO₂ kontsentratsioon, vajaduse korral;
- uuritava aine kontsentratsioonid;

▼ **M3**

- lisatud kandaine ja uuritava aine kontsentratsioon ja kogus (ja/või ruumala);
- inkubatsiooni temperatuur ja kestus;
- uuritava ainega töötlemise kestus;
- ajavahemik töötlemisest kuni rakkude kogumiseni;
- rakkude tihedus külvamisel, vajaduse korral;
- metaboolse aktiveerimise süsteemi tüüp ja koostis, sh selle heakskiitmise kriteeriumid;
- positiivse kontrolli kemikaalid ja negatiivsed kontrollid;
- mikroskoobipreparaatide valmistamise meetodid ja kasutatud värvimismeetodid;
- mikrotooma kindlakstegemise kriteeriumid;
- analüüsitud rakkude arv;
- tsütotoksilisuse mõõtmise meetodid;
- igasugune täiendav teave tsütotoksilisuse kohta;
- kriteeriumid, mille alusel uuringutulemus klassifitseeritakse positiivseks, negatiivseks või ebaselgeks;
- kasutatud statistilise analüüsi meetod(id);
- vajaduse korral meetodid, millega uuriti, kas mikrotoom sisaldab terveid kromosome või nende fragmente, näiteks kinetokoori antikeha.

Tulemused

- Tsütotoksilisuse määramise meetod, mida kasutati tsütokineesi bloki meetodi kasutamise puhul, näiteks CBPI või RI; RICC, RPD või PI, kui tsütokineesi bloki meetodeid ei kasutatud; vajaduse korral muud tähelepanekud, näiteks pinna katmine, apoptoos, nekroos, metafaaside loendamine, kahetuumsete rakkude esinemise sagedus;
- sadenemise tunnused;
- teave kasvukeskkonna pH ja osmolaalsuse kohta, kui see on määratud;
- analüüsi jaoks kõlblike rakkude määratlus;
- ühe-, kahe- ja paljutuumsete rakkude jaotus, kui kasutatakse tsütokineesi bloki meetodit;
- mikrotoomadega rakkude arv eraldi igas töödeldud ja kontrollkultuuris; vajaduse korral peab olema näidatud, kas on määratud kahetuumsetest või ühetuumsetest rakkudest;
- kontsentratsiooni ja toime vaheline sõltuvus, võimaluse korral;
- paralleelse negatiivse (lahusti/kandaine) ja positiivse kontrolli kemikaalide andmed (kontsentratsioonid ja lahustid);
- varasemate negatiivsete (lahusti/kandaine) ja positiivsete kontrollide andmed, sh vahemik, keskvärtused ja standardhälbed ning 95 % usaldusvahemik;
- statistiline analüüs; p-väärtused vajaduse korral.

*Tulemuste arutelu**Järeldused*

▼ M3

KIRJANDUS

- 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., Surrallés, 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, *Mutagenesis*, 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, *Mutagenesis*, 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, *Mutagenesis*, 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 Test*, Test Guideline No. 473, OECD Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: 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., Senju, 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., Ouldeldkim, 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 für 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), *Mutagenesis*, 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. ESAC 25th meeting, 16–17 November, 2006. Vt: <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. Vt: <http://ecvam.jrc.it/index.htm>
- 34) Corvi, R., Albertini, S., Hartung, T., Hoffmann, S., Maurici, D., Pfuhrer, S., van Benthem, J., Vanparys P. (2008), ECVAM Retrospective Validation of *in vitro* Micronucleus Test (MNT), *Mutagenesis*, 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 B₁ is genotoxic in human derived hepatoma (HepG2) cells, *Mutagenesis*, 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 Micro-Nucleus 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, pp. 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), püsivate orgaaniliste saasteainete Stockholmi konventsioon, ÜRO keskkonnaprogramm (UNEP). Vt: <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, *Mutagenesis*, 11, 247–274.
- 52) Krahn, D.F., Barsky, F.C. and McCooley, 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, pp. 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, pp. 463–467.
- 66) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 850/2004, 29. aprill 2004, püsivate orgaaniliste saasteainete kohta ning millega muudetakse direktiivi 79/117/EMÜ, ELT L 229, 30.4.2004, lk 5.

▼ **M3***1. liide***Mõisted**

Aneugeen: iga aine või protsess, mis raku mitootilise või meiootilise jagunemise tsükli komponentidega interakteerudes tekitab rakkudes või organismides aneuploidsust.

Aneuploidsus: iga kõrvalekalle normaalsest diploidsest (või haploidsest) kromosoomiarvust ühe või enama kromosoomi võrra, kuid mitte terve(te) kromosoomikomplekti(de) võrra (polüploidia).

Apoptoos: programmeeritud rakusurm, mida iseloomustab rida astmeid, mis viivad raku lagunemiseni membraaniga seotud osakesteks, mis kõrvaldatakse fagotsütoosi või väljutamisega.

Rakkude paljunemine: rakkude arvu suurenemine mitootilise rakujagunemise tagajärjel.

Tsentromeer: kromosoomi DNA-piirkond, kus mõlemad kromatiide hoitakse koos ja mille külge teineteise kõrvale kinnituvad mõlemad kinetokoorid.

Klastogeen: iga aine või protsess, mis tekitab rakkude või organismide populatsioonides struktuurseid kromosoomihälbeid.

Tsütokinees: mitoosile vahetult järgnev rakujagunemise protsess, mille tulemusel tekivad kaks tütarrakku, millest kummaski on üksainus tuum.

Tsütokineesi blokiga paljunemise indeks (cytokinesis-block proliferation index, CBPI): teise rakujagunemise rakkude osakaal töödeldud rakupopulatsioonis, võrreldes töötlemata kontrolliga (vt võrrand, 2. liide).

Tsütostaas: rakkude kasvu inhibeerimine (vt võrrand, 2. liide).

Tsütotoksilisus: kahjulik mõju raku struktuurile või funktsioonidele, mis lõpuks põhjustab raku surma.

Genotoksiline: üldine termin, mis hõlmab DNA või kromosoomide igasugust kahjustust, sealhulgas katkemisi, aduktidega seotud ümberkorraldumist, mutatsioone, kromosoomihälbeid ja aneuploidsust. Mitte kõik genotoksilised efektid ei anna tulemuseks mutatsioone või püsivat kromosoomikahjustust.

Interfaasirakud: rakud, mis ei ole mitoosifaasis.

Kinetokoor: valke sisaldav struktuur, mis koondub kromosoomi tsentromeeri juures, millele raku jagunemise ajal kinnituvad kääviniidid, võimaldades tütar-kromosoomidel korrastatult liikuda tütarakkude poolustele.

Mikrotuum: väike tuum, mis on raku põhituumast eraldi ja lisandunud põhituumale, see on moodustunud mitoosi või meioosi telofaasi ajal mahajäänud kromosoomifragmentidest või tervetest kromosoomidest.

Mitoos: rakutuuma jagunemine, mida tavaliselt jagatakse profaasiks, prometafaasiks, metafaasiks, anafaasiks ja telofaasiks.

Mitootiline indeks: metafaasis olevate rakkude arv jagatakse rakupopulatsioonis vaadeldud rakkude koguarvuga; näitab rakkude paljunemise astet kõnealuses populatsioonis.

Mutageenne: tekitab päriliku muutuse geenide DNA alusepaaride järjestuses või kromosoomide struktuuris (kromosoomihälve).

▼ M3

Mitteeraldumine: paardunud kromatiidid ei eraldu teineteisest ega liigu kujunevatesse tütarakkudesse nii, nagu see peaks normaalselt toimuma; tulemuseks on ebanormaalse kromosoomide arvuga tütarrakud.

Polüploidus: rakkude või organismi numbriline kromosoomihälve, mis hõlmab terveid kromosoomikomplekte; vastandub aneuploidsusele, mille puhul kromosoomihälve hõlmab üht või mitut kromosoomi.

Paljunemisindeks (Proliferation Index, PI): tsütotoksilisuse mõõtmise meetod, kui tsütoB-d ei kasutata (vt võrrand, 2. liide).

Rakkude arvukuse suhteline suurenemine (Relative Increase in Cell Count, RICC): tsütotoksilisuse mõõtmise meetod, kui tsütoB-d ei kasutata (vt võrrand, 2. liide).

Rakupopulatsiooni suhteline kahekordistumine (Relative Population Doubling, RPD): tsütotoksilisuse mõõtmise meetod, kui tsütoB-d ei kasutata (vt võrrand, 2. liide).

Replikatsiooniindeks (Replication Index, RI): lõpuni kulgenud rakujagunemistsükli osakaal töödeldud rakukultuuris, võrreldes töötlemata kontrolliga, rakkude töötlemise ja toibumise ajal (vt võrrand, 2. liide).

Uuritav kemikaal (ka „uuritav aine“): iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M3**

2. liide

Tsütotoksilisuse hindamise võrrandid

1. *Kui kasutatakse tsütoB-d*, peaks tsütotoksilisus põhinema tsütokineesi blokiga paljunemise indeksil (cytokinesis-block proliferation index, CBPI) või replikatsiooniindeksil (RI) (16, 58). CBPI näitab rakutsüklite keskmist arvu raku kohta tsütoB-ga kokkupuutumise aja jooksul ja seda võib kasutada raku paljunemise arvutamiseks. Replikatsiooniindeks RI näitab tuumade suhtelist arvu töödeldud kultuurides võrrelduna kontrollkultuuridega ja seda võib kasutada tsütostaasi protsendi arvutamiseks:

$$\text{tsütostaasi \%} = 100 - 100\{(\text{CBPI}_T - 1) \div (\text{CBPI}_C - 1)\}$$

ning

T = uuritava kemikaaliga töödeldud kultuur

C = kandeaine kontrolli kultuur

siis:

$$\text{CBPI} = \frac{((1 - \text{tuums. rakkude arv}) + (2 \times 2 - \text{tuums. rakkude arv}) + (3 \times \text{paljutuums. rakkude arv}))}{(\text{rakkude koguarv})}$$

Seega vastab CBPI väärtus 1 (kõik rakud on ühetuumsed) 100 % tsütostaasile.

$$\text{Tsütostaas} = 100 - \text{RI}$$

$$\text{RI} = \frac{((2 - \text{tuums. rakkude arv}) + (2 \times 1 - \text{tuums. rakkude arv})) \div (\text{rakkude koguarv})_T}{((2 - \text{tuums. rakkude arv}) + (2 \times 1 - \text{tuums. rakkude arv})) \div (\text{rakkude koguarv})_C} \times 100$$

T = töödeldud kultuurid

C = kontrollkultuurid

2. RI = 53 % tähendab seega, et kui kontrollkultuurides on teatav arv rakke jagunenud ja moodustanud kahetuumsed ja paljutuumsed rakke, siis töödeldud kultuuris on jagunenud kõigest 53 % sellest arvust, see tähendab 47 % oli tsütostaasi.

3. *Kui tsütoB-d ei kasutata*, soovitatakse tsütotoksilisust hinnata rakkude arvukuse suhtelise suurenemise (Relative Increase in Cell Counts, RICC) või raku-populatsiooni suhtelise kahekordistumise (Relative Population Doubling, RPD) järgi (58), kuna mõlema näitaja puhul võetakse arvesse jagunenud rakkude osakaalu rakupopulatsioonis.

$$\text{RICC} = \frac{(\text{rakkude arvu suurenemine töödeldud kultuurides (lõplik - alguses)})}{(\text{rakkude arvu suurenemine kontrollkultuurides (lõplik - alguses)})} \times 100$$

$$\text{RPD} = \frac{(\text{populatsiooni kahekordistumiste arv töödeldud kultuurides})}{(\text{populatsiooni kahekordistumiste arv kontrollkultuurides})} \times 100$$

▼M3

kus:

populatsiooni kahekordistumine = $[\log(\text{rakkude arv pärast töötlust} \div \text{esialgne rakkude arv})] \div \log 2$

4. Seega tähendab 53 % RICC või RPD, et 47 % oli tsütotoksilisust/tsütostaasi.

5. Tsütotoksilisust võib hinnata 1 rakust koosnevate kloonide (c11), 2 rakust koosnevate kloonide (c12), 3–4 rakust koosnevate kloonide (c14) ja 5–8 rakust koosnevate kloonide (c18) loendamise ja paljunemisindeksi (PI) kasutamisega:

$$PI = \frac{((1 \times c11) + (2 \times c12) + (3 \times c14) + (4 \times c18))}{(c11 + c12 + c14 + c18)}$$

6. PI-d on kasutatud tsütotoksilisuse väärtusliku ja usaldusväärse näitajana ka rakuliinide puhul, mida on kultiveeritud *in situ* tsütob puudumisel (25, 26, 27, 28).

▼ **M3**

3. liide

Tulemuslikkuse hindamiseks soovitatavad võrdluskemikaalid ⁽¹⁾

Kategooria	Kemikaal	CASi nr	EÜ nr
1. Ilma metaboolse aktivatsioonita toimivad klastogeenid			
	tsütosiinarabinoosiid	147-94-4	205-705-9
	mitomütsiin C	50-07-7	200-008-6
2. Metaboolset aktivatsiooni vajavad klastogeenid			
	benso(a)püreen	50-32-8	200-028-5
	tsüklofosfamiid	50-18-0	200-015-4
3. Aneugeenid			
	kolhitsiin	64-86-8	200-598-5
	vinblastiin	143-67-9	205-606-0
4. Negatiivsed ained			
	di-(2-etiülheksüül)ftalaat	117-81-7	204-211-0
	nalidikshape	389-08-2	206-864-7
	püreen	129-00-0	204-927-3
	naatriumkloriid	7647-14-5	231-598-3

⁽¹⁾ Võrdluskemikaalid on kasutamiseks soovitatavad kemikaalid. Võrdluskemikaale võib asendada või lisada loetelusse uusi kemikaale, kui nende toime on teada ja need tekitavad mikrotoomi sama toimemehhanismi kaudu ning on näidatud, et need on asjakohased MNvit-eeskirja järgi uuritavate kemikaalide puhul. Otstarbest olenevalt võiks põhjendus hõlmata ka paljude erinevate ainete teatud valideerimisuuringut või valideerimisuuringut, mis on suunatud kitsamale aineteringile, mis on seotud uuritava aine kemikaaliklassiga või uuritava kahjustusmehhanismiga.

▼ M3

B.50. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÖLMEDE KATSE: DA

SISSEJUHATUS

1. OECD kemikaalide katsetamise juhendeid ja ELi katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Esialgne katsemeetod (B.42) naha sensibiliseerimise määramiseks hiirtel lokaalsete lümfisõlme katsega (*Local Lymph Node Assay* – LLNA; OECD katsejuhend 429) on läbi vaadatud (1). Kirjanduses on avaldatud LLNA valideerimise üksikasjad ja ülevaade sellega seotud töödest (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). LLNA-meetodi järgi kasutatakse lümfotsüütide paljunemise määramiseks radioaktiivse isotoobiga märgistatud tümidüüni või joodi ja seepärast ei saa katset kasutada, kui radioaktiivsete ühendite hankimine, kasutamine või kõrvaldamine tekitab probleeme. LLNA: DA (mille töötas välja Daicel Chemical Industries, Ltd.) on LLNA variant, mis on vaba radioaktiivsusest ja milles lümfotsüütide paljunemise näitajana kasutatav adenosiintrifosfaadi (ATP) sisaldus määratakse bioluminesentsi abil. Katsemeetod LLNA: DA on valideeritud ja läbi vaadatud ning rahvusvaheline eksperdiühingu komisjon soovib seda, kuna leiab, et see sobib naha sensibiliseerumist põhjustavate ja mittepõhjustavate kemikaalide kindlakstegemiseks, arvestades teatavaid piiranguid (10, 11, 12, 13). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata katseloomadel kemikaalide (ainete ja segude) võimet sensibiliseerida nahka. Käesoleva lisa peatükis B.6 ja OECD katsejuhendis 406 kasutatakse merisigu, nimelt merisigade maksimeerimise katset ja Buehleri katset (14). LLNA-d (käesoleva lisa peatükk B.42, OECD katsejuhendis 429) ja selle kahte radioaktiivsuse kasutamise versiooni, need on LLNA: DA (käesoleva lisa peatükk B.50, OECD katsejuhendis 442 A) ja LLNA: BrdU-ELISA (käesoleva lisa peatükk B.51, OECD katsejuhendis 442 B), tuleb eelistada meriseakatsetele peatükis B.6, OECD katsejuhendis 406 (14), kuna nendega vähendatakse ja täiustatakse katseloomade kasutamist.
2. Nii nagu LLNA puhul, uuritakse LLNA: DA katsetes naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ja saadakse kvantitatiivseid andmeid immuunvastuse annusest sõltuvuse hindamiseks. Lisaks kõrvaldab võimalus määrata naha sensibiliseerijaid ilma DNA radioaktiivset märgist kasutamata tööalase kokkupuute radioaktiivsusega ja radioaktiivsete jäätmete probleemi. See omakorda võimaldab naha sensibiliseerijate määramiseks kasutada rohkem hiiri, millega võiks veelgi väheneda merisigade kasutamine (s.o peatükk B.6, OECD katsejuhendis 406) (14) selleks otstarbeks.

MÕISTED

3. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. LLNA: DA on muudetud LLNA-meetod võimalike naha sensibiliseerivate kemikaalide kindlakstegemiseks, millel on aga teatavad piirangud. See ei tähenda tingimata, et kõikidel juhtudel tuleks kasutada LLNA või merisigadega tehtavate katsete (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (14) asemel LLNA: DA-d, vaid pigem, et uuring on sama hea ja seda võib kasutada alternatiivina, mille positiivsed või negatiivsed tulemused üldiselt ei vaja täiendavat kinnitamist (10, 11). Katselabor võtab arvesse kogu uuritava aine

▼ M3

kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist. Selline teave hõlmab aine nimetust ja keemilist struktuuri, füüsikalis-keemilisi omadusi, muude ainetega *in vitro* või *in vivo* tehtud toksilisuskatsete tulemusi ja struktuurilt samalaadsete ainete toksikoloogilisi andmeid. Osutatud teavet tuleb analüüsida, et määrata kindlaks, kas LLNA: DA sobib kõnealuse aine puhul (arvestades LLNA: DA sobimatust teatavate piiratud kemikaalitüüpide puhul, vt punkt 5) ning valida sobivad annused.

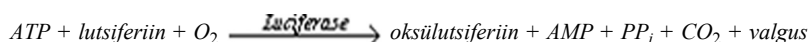
5. LLNA: DA on *in vivo* meetod ja seetõttu ei lõpetata see loomade kasutamist naha allergilise sensibiliseerimise hindamisel. Sellega on siiski võimalik vähendada katseloomade kasutamist selleks otstarbeks, võrreldes merisigadega tehtavate katsetega (B.6, OECD katsejuhik 406) (14). Lisaks võimaldab LLNA: DA oluliselt parandada viisi, kuidas loomi kasutatakse naha allergilise sensibiliseerimise määramiseks (vähem tekitatakse valu ja kannatusi), kuna erinevalt B.6st ja OECD katsejuhendist 406 ei eelda LLNA: DA, et naha ärritamisega tekitataks ülitundlikkusreaktsioone. Hoolimata LLNA: DA eelistest B.6 või OECD katsejuhendi 406 (14) kohaste katsetega võrreldes on teatud piirangud, mis võivad tingida B.6 või OECD katsejuhendi kohaste katsete 406 kasutamist (nt teatavate metallide katsetamine, valepositiivsed teatavate nahaärritajate puhul (näiteks teatavat tüüpi pindaktiivsed kemikaalid) (6) (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42), uuritavate ainete lahustuvus). Lisaks võib teatavate kemikaalide või ainete puhul, mis sisaldavad segavat toimet avaldada võivad funktsionaalseid rühmi (16), olla vaja kasutada meriseakatseid (st B.6 või OECD katsejuhendit 406 (14)). LLNA puhul kindlaks tehtud piiranguid (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42) on peetud kehtivateks ka LLNA: DA puhul (10). Lisaks ei tarvitse LLNA: DA kasutamine olla sobiv selliste ainete uurimiseks, mis mõjutavad ATP taset (näiteks ATP inhibiitorina toimivad ained) või segavad rakusisese ATP täpset määramist (nt ATPd lagundavate ensüümide juuresolek, rakuvälise ATP olemasolu lümfisõlmes). Selliste teadaolevate piirangute arvestamisega peaks LLNA: DA olema kohaldatav igasuguste ainete uurimiseks, millel ei ole omadusi, mis võiksid mõjutada LLNA: DA ga saadavate tulemuste õigsust. Lisaks sellele tuleks kaaluda piiripealse positiivse tulemuse võimalust, kui stimulatsiooniindeksi (SI) väärtus tuleb vahemikku 1,8–2,5 (vt punktid 31–32). See tugineb 44 ainest koosnevale valideerimise andmebaasile, milles kasutati SI väärtusi $\geq 1,8$ (vt punkt 6), millest LLNA: DA võimaldas õigesti kindlaks teha kõik 32 LLNA järgi sensibiliseerijat, kuid mis andis vale tulemuse kolme aine puhul 12st LLNA järgi mitte sensibiliseerivast ainest, mille SI oli 1,8–2,5 (st piiripealsed positiivsed tulemused) (10). Kuid kuna samu andmeid kasutati SI väärtuste kindlaksmääramiseks ja katsemeetodi ennustusvõime arvutamiseks, võivad esitatud tulemused viia tegeliku ennustusvõime ülehindamisele.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

6. LLNA: DA põhimõte seisneb selles, et sensibilisaatorid kutsuvad esile lümfotsüütide vohamise lähimates lümfisõlmedes, mis drenivad uuritava aine pealekandmise paika. Vohamine on võrdeline pealekantud allergeeni annuse ja allergiatekitamisvõimega ning see võimaldab lihtsa meetodiga sensibiliseerimist kvantitatiivselt mõõta. Vohamist mõõdetakse nii, et keskmine vohamist igas katserühmas võrreldakse keskmise vohamisega kandeaine-kontrollrühmas, mille liikmeid on töödeldud üksnes kandeainega (*vehicle treated control* – VC). Määratakse igas uuritava ainega töödeldud

▼ **M3**

rühmas leitud keskmise vohamise ja paralleelselt kandeaine-kontrollrühmas leitud keskmise vohamise suhtarv, mida nimetatakse stimulatsiooniindeksiks (SI); SI peab olema vähemalt 1,8 selleks, et katseaine kui naha võimaliku sensibiliseeriija edasine hindamine oleks vajalik. Siin kirjeldatud meetod põhineb sellel, et bioluminestsentsi järgi mõõdetakse ATP sisaldust ja (kuna see korreleerub elusrakkude arvuga) (17) hinnatakse selle järgi paljunevate rakkude arvu suurenemist kõrvalesta dreenivates lümfisõlmedes (18, 19). Bioluminestsentsi meetodis kasutatakse ensüümi lutsiferaasi, mis katalüüsib valguse tekkimist ATPst ja lutsiferiinist vastavalt järgmisele reaktsioonile:



Eralduva valguse intensiivsus on lineaarselt seotud ATP kontsentratsiooniga ja seda mõõdetakse luminomeetriga. Lutsiferiini-lutsiferaasi katse on tundlik meetod ATP kvantitatiivseks mõõtmiseks ja seda kasutatakse paljudes meetodites (20).

KATSE KIRJELDUS**Loomaliigi valimine**

7. Käesoleva katse jaoks valitud liik on hiir. LLNA: DA valideerimisuuringud tehti ainult CBA/J-liini hiirtega, mida seepärast peetakse eelistatavaks liiniks (12, 13). Kasutatakse noori täiskasvanud emashiiri, kes ei ole poeginud ega tiined. Katse alguses peaksid loomad olema 8–12 nädalat vanad ning loomade kehamassi varieerumine peaks olema minimaalne ja mitte ületama 20 % keskmisest massist. Võib kasutada ka muid liine ja isasloomi, kui on olemas piisavalt andmeid selle tõendamiseks, et LLNA: DA immuunvastuses ei ole olulisi liini- ja/või soospetsiifilisi erinevusi.

Pidamis- ja söötmingimused

8. Hiiri tuleks pidada rühmapuurides (21), kui ei esitata nõuetekohast teaduslikku põhjendust üksikpuuris pidamise kasuks. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapäraselt labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata.

Loomade ettevalmistamine

9. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks (kuid mitte kõrvamärkidega) ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise algust, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega. Enne katse alustamist uuritakse kõiki loomi, et neil ei oleks nähtavaid nahakahjustusi.

Annustamislahuste valmistamine

10. Tahke uuritava aine tuleb lahustada või suspendeerida lahustis või kandeaines ja vajaduse korral lahjendada enne hiire kõrvalestale määrimist. Vedelaid kemikaale võib annustada puhtal kujul või lahjendada enne annustamist. Lahustumatuid keemilisi aineid, näiteks aineid, mida kasutatakse meditsiini-seadmetes, tuleb enne hiire kõrvalestale kandmist sobiva solvendiga tõhusalt ekstraheerida, et teha kindlaks kõik ekstraheeritavad koostisained, mille mõju tuleks uurida. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

▼ M3

Usaldusväärse kontroll

11. Positiivse kontrolli kemikaale kasutatakse selleks, et tõendada katsemetodi vajaliku tulemuslikkust: sensibiliseerivate uuritavate ainetega, mille puhul immuunvastuse ulatus on hästi kirjeldatud, saadakse õige ja korratav tulemus. Soovitatakse teha paralleelselt positiivse kontrolli katse, kuna see tõendab labori võimet teha iga katse õigesti ning võimaldab hinnata laborisest ja laboritevahelist korratavust ja võrreldavust. Mõned reguleerivad asutused nõuavad positiivset kontrolli iga uuringu puhul ja seepärast soovitatakse käesoleva meetodi kasutajatel konsulteerida enne LLNA: DA tegemist asjakohaste asutustega. Seepärast soovitatakse alati teha paralleelselt positiivse kontrolli katsed, et vältida vajadust teha täiendavaid loomkatseid, et täita nõudeid, mis võivad tekkida perioodilise positiivse kontrolli kasutamise puhul (vt punkt 12). Positiivne kontroll peaks andma positiivse LLNA: DA immuunvastuse kokku puutetasemel, mis eeldatavasti suurendab stimulatsiooniindeksit (SI) 1,8 korda või enam, võrreldes negatiivse kontrollrühmaga. Positiivse kontrolli annus tuleks valida nii, et see ei põhjustaks ulatuslikku nahaärritust või süsteemset mürgitust ja tekitatav mõju oleks korratav, kuid mitte liiga suur (näiteks stimulatsiooniindeksit üle 10 peetakse liiga suureks). Eelistatud positiivse kontrolli ained on 25 % heksüülkaneelaldehüüd (Chemical Abstracts Service (CASi) number 101-86-0) ja 25 % eugenool (CASi number 97-53-0) atsetooni-oliiviõli segus (4: 1, v/v). Võib olla olukordi, kus piisavalt põhjendatult võib kasutada muid positiivse kontrolli aineid, mis vastavad eespool esitatud kriteeriumidele.

12. Kuigi igas katses soovitatakse paralleelselt teha katsed ka positiivse kontrolli rühmaga, võib esineda olukordi, kus labori jaoks, milles korrapäraselt (st vähemalt kord kuus) tehakse LLNA: DAD ja on olemas varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaas, mis tõendab labori võimet saada korratavaid ja õigeid positiivse kontrolli tulemusi, võib sobiv olla perioodiline positiivse kontrolli tegemine (näiteks kuni kuue kuu järel). Vajalikku oskuste taset LLNA: DA alal võib tõendada vähemalt kümne sõltumatu ja omavahel kooskõlas oleva positiivse kontrolli katsega, mis on tehtud mõistliku ajavahemiku (vähem kui aasta) jooksul.

13. Paralleelset positiivse kontrolli rühma tuleb alati kasutada siis, kui muutub LLNA: DA läbiviimine (näiteks uued väljaõppe saanud töötajad, katsemetodi materjalide ja/või reaktiivide muutus, katsemetodi läbiviimise tehniliste vahendite muutus, uus katseloomade tarnija), ja sellised muutused tuleb laboriprotokollis dokumenteerida. Tuleb analüüsida selliste muutuste mõju varasemate katsetega loodud andmebaasi järjepidevusele ja otsustada, kas on vaja teha uus andmebaas, et dokumenteerida kooskõla varasemate positiivse kontrolli tulemustega.

14. Meetodi kasutajad peaksid teadma, et otsus kasutada positiivset kontrolli perioodiliselt, mitte paralleelselt, mõjutab perioodilise positiivse kontrolli vahepealsel ajal ilma positiivse kontrollita saadud negatiivsete uuringutulemuste adekvaatsust ja vastuvõetavust. Kui perioodilise positiivse kontrolli katse saadakse näiteks valenegatiiv, võib ajavahemikus viimasest vastuvõetavast positiivse kontrolli katsest kuni vastuvõetamatu kontrollkatseni uuritavate ainetega saadud negatiivsed tulemused panna kahtluse alla. Selliste tulemuste tähendust tuleks hoolikalt analüüsida, kui otsustatakse, kas teha positiivse kontrolli katseid paralleelselt või üksnes perioodiliselt. Mõelda tuleb ka, kuidas kasutada vähem loomi paralleelse positiivse kontrolli rühmas, kui see on teaduslikult põhjendatud ja kui labor tõendab oma varasemate andmetega, et on võimalik kasutada vähem hiiri (22).

▼ **M3**

15. Kuigi positiivset kontrollainet tuleks uurida kandeaines, mis teatavasti annab teatava kindla immuunvastuse (nt atsetoon-oliiviõli, suhtes 4: 1, v/v), võib esineda teatavaid regulatiivseid olukordi, milles on vaja teha katseid ka ebatavalise kandeainega (kliiniliselt või keemiliselt asjakohane segu) (23). Kui paralleelset positiivse kontrolli katsed tehakse muu kandeainega kui uuritava aine puhul, on vaja moodustada eraldi veel positiivse kontrolli kandeaine-kontrollrühm.
16. Kui uuritakse teatava keemiliste ühendite klassi aineid või mõõdetakse nende poolt esile kutsutava immuunvastuse vahemikku, võib olla kasulik mõõta teatavaid võrdlusaineid, millega tõendatakse, et katse võimaldab õigesti määrata kõnealuste ühenditüüpide võimet nahka sensibiliseerida. Sobival võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused:
- struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega;
 - teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused;
 - varasemad toetavad LLNA: DA andmed;
 - toetavad andmed muude katseloomade ja/või inimese kohta.

KATSE KÄIK**Loomade arv ja annusemäärad**

17. Ühes annuserühmas on vähemalt neli looma, kasutatakse vähemalt kolme uuritava aine kontsentratsiooni ja paralleelselt negatiivset kontrollrühma, keda töödeldakse üksnes kandeainega, mida kasutatakse uuritava aine puhul, ning positiivse kontrolli rühma (kas paralleelne või hiljutine positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15). Tuleb kaaluda positiivse kontrolli tegemist mitme annusega, eriti kui positiivset kontrolli tehakse aeg-ajalt. Kontrollrühma loomi koheldakse ja töödeldakse nii nagu katserühma loomi, välja arvatud töötlemine uuritava ainega.
18. Annuse ja kandeaine valik peaks põhinema viidetes 2 ja 24 antud soovitel. Tavaliselt valitakse järjestikused annused sobivast kontsentratsioonide reast, näiteks 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. Kasutatava kontsentratsioonide rea valimisel peaks olema asjakohane teaduslik põhjendus. Tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad toksikoloogiaandmed (nt ägeda toksilisuse ja nahaärrituse kohta) ning andmed uuritava aine struktuuri ja füüsikalise-keemiliste omaduste kohta ning valida kolm järjestikust kontsentratsiooni nii, et kõrgeim kontsentratsioon tagab maksimaalse võimaliku kokkupuute, kuid selle puhul ei avaldu süsteemset toksilisust ega liiga suurt paikset nahaärritust (24, 25). Sellise teabe puudumisel võib olla vajalik teha esialgne sõelkatse (vt punktid 21–24).
19. Kandeaine ei tohiks segada katse tegemist ega muuta katse tulemust ja tuleks valida nii, et viia lahustuvus maksimumini, et kasutada kõrgeimat võimalikku kontsentratsiooni ja saada ühtlasi uuritava aine pealekandmiseks sobiv lahus või suspensioon. Soovitavad kandeained on atsetoon-oliiviõli (4: 1, v/v), *N,N*-dimetüülformamiid, metüületüülketoon, propüleen-glükool ja dimetüül-sulfoksiid (6), kuid võib kasutada ka muid kandeaineid, kui esitada selleks piisav teaduslik põhjendus. Teatud olukorras võib osutada vajalikuks kasutada täiendavaks kontrolliks kliiniliselt asjakohast lahustit või kaubanduslikku valmistist, milles uuritavat ainet turustatakse. Tuleks jälgida, et hüdriidid ei kantaks peale kandeainesüsteemi abil, mis märgab nahka ega voola nahalt kohe maha; selleks lisatakse sobivaid solubiliseerijaid (nt 1 % Pluronic® L92). Seepärast tuleks täielikku vesilahust vältida.

▼ **M3**

20. Iga üksiku hiire lümfisõlmede töötlemine võimaldab hinnata loomadevahelist varieeruvust ja statistiliselt võrrelda uuritavate ainete teatud mõõtmiste ja kandeaine-kontrollrühma mõõtmiste erinevust (vt punkt 33). Lisaks saab positiivse kontrolli rühma hiirte arvu vähendamise võimalikkust hinnata siis, kui kogutakse iga üksiku hiire andmeid (22). Lisaks nõuavad mõned reguleerivad asutused iga üksiku looma andmete kogumist. Üksikuid loomi käsitlevate andmete korrapärane kogumine annab loomade heaoluga seotud eelise, kuna võimaldab vältida korduvate uuringute tegemist, mis oleks hädavajalik, kui uuritavate ainete tulemusi, mis algselt on kogutud ühel viisil (näiteks loomade andmete ühendamise), peaks reguleeriv asutus hiljem vaatlema teiste nõuete alusel (näiteks üksikloomade andmete põhjal).

Esialgne sõelkatse

21. Kui ei ole andmeid suurima uuritava annuse kindlaksmääramiseks (vt punkt 18), tuleks teha esialgne sõelkatse, et leida LLNA: DA jaoks sobiv annuste vahemik. Esialgse sõelkatse eesmärk on saada andmeid, mille järgi määrata suurim LLNA: DA põhikatses kasutatav annus, kui ei ole teada kontsentratsioon, millel avaldub süsteemne toksilisus (vt punkt 24) ja/või tekib ülemäärane nahaärritus (vt punkt 23). Suurim uuritav annus peab olema 100 % vedela katseaine puhul või kõrgeim võimalik kontsentratsioon tahke aine või suspensiooni puhul.
22. Esialgne sõelkatse tehakse samades tingimustes kui LLNA: DA põhikatses, kuid ei hinnata lümfisõlmede vohamist ja annuserühma kohta võidakse kasutada vähem katseloomi. Annuserühmas on soovitatavalt üks või kaks hiirt. Kõiki hiiri vaadeldakse iga päev, et leida süsteemse toksilisuse kliinilisi ilminguid või paikset nahaärritust pealekandmiskohas. Registreeritakse keha-kaal enne katset ja enne katse lõppu (8. päev). Iga hiire kumbagi kõrvalesta uuritakse punetuse suhtes ja hinnatakse selle aste, kasutades tabelit 1 (25). Kõrvalesta paksust mõõdetakse paksusemõõtja (nt digitaalne mikromeeter või paksusemõõtja Peacock Dial) abil 1. päeval (enne annustamist), 3. päeval (ligikaudu 48 tundi pärast esimest annust), 7. päeval (24 tundi enne katse lõpetamist) ja 8. päeval. Lisaks võib 8. päeval mõõta kõrvalesta paksuse, milleks pärast looma humaanset surmamist lüüakse kõrvalestast mulgustajaga välja tükk ja kaalutakse. Ulatuslikku paikset nahaärritust näitab vähemalt hindele 3 vastav punetus ja/või kõrvalesta paksuse suurenemine vähemalt 25 % mõnel mõõtmispäeval (26, 27). LLNA: DA põhikatses jaoks valitud suurim annus on järgmine väiksem annus esialgse sõelkatse kontsentratsioonide reas (vt punkt 18), mille puhul ei avaldu süsteemne toksilisus ega teki ülemäärast nahaärritust.

Tabel 1

Punetuse hinne

Nähud	Hinne
Nahapunetust ei esine	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus	1
Selgesti nähtav nahapunetus	2

▼ M3

Nähud	Hinne
Mõõdukas kuni tugev nahapunetus	3
Tugev nahapunetus (meenutab peeti) kuni kooriku tekkimine, mis takistab nahapunetuse astme edasist täpsustamist	4

23. Lisaks kõrvalesta paksuse 25 % suurenemisele (26, 27) on ärritust tekitavate ainete kindlakstegemiseks LLNA abil kasutatud ka kõrvalesta paksuse statistiliselt olulist suurenemist töödeldud hiirtel, võrreldes kontrollrühma hiirtega (28, 29, 30, 31, 32, 33, 34). Ent kuigi statistiliselt oluline kõrvalesta paksuse suurenemine võib olla ka väiksem kui 25 %, ei ole selline paksuse suurenemine konkreetselt seotud ülemäärase nahaärritusega (30, 31, 32, 33, 34).
24. Kui kliinilisi uuringuid kasutatakse LLNA: DA põhikatses kasutatava suurima annuse hindamise osana, siis süsteemset toksilisust (35) võivad näidata järgmised kliinilised tunnused: närvisüsteemi talitluse muutused (nt karva püstitõusmine, liigutuste koordineerimise kadu, värin ja krampid), käitumise muutused (nt agressiivsus, muutus oma karvkatte hooldamises, liikumisaktiivsuse oluline muutus), hingamise muutused (s.o hingamissageduse ja -sügavuse muutused, nagu raskendatud hingamine, õhuahmimine, räginad) ning muutused toidu ja vee tarbimises. Lisaks tuleb hindamisel arvestada letargia ja/või mittereageerimise märke ning rohkem kui kerge või lühiajalise valu või ebamugavustunde kliinilisi tunnuseid, samuti rohkem kui 5 % kehakaalu vähenemist ajavahemikus 1.–8. päevani ning suremust. Suremas olevad loomad ja loomad, kes näitavad suure valu või kannatuste tunnuseid, tuleks humaanselt surmata (36).

Põhiuuringu katse ajakava

25. Katse ajakava on järgmine.
- *1. päev:* määratakse iga üksiku looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Kummagi kõrvalesta välisküljele kantakse naatriumlaurüülsulfaadi (SLS) 1 % vesilahust, kasutades SLSi lahusesse kastetud pintslit ja kattes kogu kõrvalesta väliskülje nelja-viie pintslitõmbega. Üks tund pärast SLSiga töötlemist kantakse kummagi kõrvalesta välisküljele 25 µl sobivalt lahjendatud uuritava ainet, üksnes kandeainet või positiivse kontrolli ainet (paralleelne või hiljutine perioodiline positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15).
 - *2., 3. ja 7. päev:* korratakse 1. päeval tehtud eeltöötlust SLSi 1 % vesilahusega ja uuritava aine pealekandmist.
 - *4., 5. ja 6. päev:* loomi ei töödelda.
 - *8. päev:* määratakse iga looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Ligikaudu 24–30 tundi pärast 7. päeval toimunud uuritava aine pealekandmise algust surmatakse loomad humaanselt. Igal hiirel lõigatakse välja kumbagi kõrvalesta dreenivad lümfisõlmed ja töödeldakse eraldi iga hiire lümfisõlmi fosfaatpuhvriga soolalahuses. Lümfisõlmede leidmise ja väljalõikamise üksikasjad ja joonised on esitatud viites (22). Paiksete naha immuunvastuste edasiseks jälgimiseks põhikatses võib katseprotokolli kanda ka täiendavad näitajad, nagu kõrvalesta punetuse hinnang või kõrvalesta paksuse mõõtmise andmed (mis saadakse kas paksuse mõõtmisega või pärast surmamist kõrvalestast mulgustajaga välja löödud tüki massi mõõtmisega).

▼ **M3****Rakususpensioonide valmistamine**

26. Valmistatakse iga hiire mõlemalt küljelt välja lõigatud lümfisõlmerakkude üherakuline suspensioon, milleks lümfisõlmed pannakse kahe objektiklaasi vahele ja purustatakse klaaside kerge surumisega üksteise vastu. Pärast selle kontrollimist, kas kude on jaotunud õhukese kihina, eraldatakse objektiklaasid teineteisest. Mõlemal objektiklaasil olev kude suspendeeritakse fosfaatpuhvriga soolalahuses, milleks kumbagi objektiklaasi hoitakse kaldu Petri tassi kohal ja loputatakse puhverlahusega, kraapides samal ajal rakukaabitsaga kudet klaasi küljest lahti. Negatiivse kontrolli loomade lümfisõlmed on väiksed, seepärast on tähtis tegutseda ettevaatlikult, et vältida igasugust kõrvalist mõju SI väärtustele. Kokku tuleks mõlema objektiklaasi loputamiseks kasutada 1 ml fosfaatpuhvriga soolalahust. Lümfisõlmerakkude suspensioon Petri tassil tuleb rakukaabitsaga kergelt homogeniseerida. Seejärel võetakse mikropipetiga 20 µl alikvoot lümfisõlmerakkude suspensioonist, püüdes mitte võtta silmaga nähtavat membraani, ja segatakse siis 1,98 ml fosfaatpuhvriga soolalahusega, nii et kokku saadakse 2 ml proovi. Samal viisil valmistatakse siis teine 2 ml proov, nii et iga looma kohta saadakse kaks proovi.

Rakkude vohamise määramine (lümfotsüütide ATP-sisalduse mõõtmine)

27. Lümfisõlmede ATP-sisalduse suurenemine määratakse lutsiferiin-lutsiferaasi meetodiga, kasutades ATP mõõtmise komplekti, millega bioluminestsents määratakse suhtelises luminesentsi ühikutes (RLU). Katse tegemise aeg looma tapmisest kuni ATP-sisalduse mõõtmiseni peaks iga üksiku looma puhul olema ühesugune, umbes 30 minuti piires, kuna ATP-sisaldus pärast looma tapmist möödunud ajaga järk-järgult väheneb (12). Seega tuleks kogu tegevus kõrvalesta lümfisõlmede väljalõikamisest kuni ATP mõõtmiseni lõpetada 20 minuti jooksul vastavalt ettemääratud ajakavale, mis on kõikide loomade puhul ühesugune. ATP luminesents tuleks mõõta kummaski 2 ml proovis, nii et kokku saadakse iga looma kohta kaks ATP mõõtmist. Seejärel määratakse kindlaks keskmine ATP luminesents ja kasutatakse seda edasistes arvutustes (vt punkt 30).

TÄHELEPANEKUD**Kliinilised tähelepanekud**

28. Vähemalt kord päevas tuleks igal loomal hoolikalt vaadelda kliiniliste tunnuste esinemist – kas annustamiskoha paikset ärritust või süsteemset toksilisust. Iga hiire kohta registreeritakse süstemaatiliselt kõik tähelepanekud. Jälgimiskavas tuleks ette näha kriteeriumid, mille alusel tehakse kiiresti kindlaks ja surmatakse valutult hiired, kellel avaldub süsteemne toksilisus, ülemäärane paikne nahaärritus või -söövitus (36).

Kehamass

29. Vastavalt punktile 25 tuleks mõõta iga looma kehamass katse alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist.

TULEMUSTE ARVUTAMINE

30. Iga katserühma tulemused väljendatakse keskmise stimulatsiooniindeksi (SI) kaudu. SI leidmiseks jagatakse iga uuritava aine rühma ja positiivse kontrollrühma keskmine RLU hiire kohta lahusti-/kandaine-kontrollrühma keskmise RLU-ga hiire kohta. Keskmine SI kandaine-kontrollrühmade puhul on seega 1.

▼ **M3**

31. Otsustamisel peetakse tulemust positiivseks, kui SI on vähemalt 1,8 (10). Kuid piiripealse tulemuse (SI väärtus vahemikus 1,8–2,5) positiivseks leiuks kuulutamise otsuse tegemisel võib kasutada ka annuse-immuunvastuse sõltuvuse tugevust, statistilist olulisust ja lahusti/kandeaine ning positiivse kontrolli tulemuste kooskõlalisust (2, 3, 37).
32. Kui SI on vahemikus 1,8–2,5, st tegemist on piiripealse positiivse tulemusega, võivad meetodi kasutajad võtta koos SI väärtusega arvesse lisateavet, nagu annuse-immuunvastuse sõltuvus, tõendid süsteemse toksilisuse või tugeva nahaärrituse kohta ja vajaduse korral statistilist olulisust, mis kinnitavad positiivset tulemust (10). Arvesse tuleks võtta ka uuritava aine mitmesuguseid omadusi, sealhulgas struktuurilist sarnasust teadaolevate naha sensibiilisaatoritega, omadust põhjustada hiirel tugevat paikset nahaärritust ning annuse-immuunvastuse sõltuvuse laadi. Neid ja muid kaalutlusi on üksikasjalikult arutatud mujal (4).
33. Andmete kogumine üksiku hiire tasandil võimaldab statistiliselt analüüsida, kas andmetes on näha annuse-immuunvastuse vahelist sõltuvust ja kui tugev see on. Iga statistiline hindamine peaks hõlmama annuse-immuunvastuse sõltuvuse hindamist ja katserühmade läbimõeldud võrdlemist (näiteks paari- või kolme-annuserühmade ja paralleelsete lahuse-/kandeaine-kontrollrühmade võrdlemine). Statistiline analüüs võib hõlmata näiteks lineaarset regressiooni või Williama testi annuse-immuunvastuse sõltuvuste hindamiseks ja Dunnetti paari- või kolme-annuserühmade võrdluste testi. Statistilise analüüsi sobiva meetodi valimisel peaks uurija kogu aeg arvesse võtma võimalikke dispersioonide ebavõrdsust ja muid seonduvaid probleeme, mille tõttu võib vaja minna andmete teendamist või mitteparameetrilist statistilist analüüsi. Igal juhul võib uurijal olla vaja teha SI arvutusi ja statistilist analüüsi kõigi andmepunktidega ja siis mõne andmepunkti kõrvalejätmisega (nn võõrväärtused).

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmed**

34. Andmed tuleks kokku võtta tabeli vormis; tabelis esitatakse iga üksiklooma RLU väärtused, rühma keskmine suhte RLU/katseloom väärtus, selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ja iga annuserühma keskmine SI, võrrelduna paralleelse lahusti/kandeaine-kontrollrühma SI-ga.

Katsearuanne

35. Katsearuandes esitatakse järgmine teave:

uuritavad kemikaalid ja kontrollkemikaalid:

- tunnusandmed (näiteks CASi ja EÜ numbrid, kui on teada; allikas; puhtus; teadaolevad lisandid; partii number);
- füüsikaline laad ja füüsikalised omadused (nt lenduvus, stabiilsus, lahustuvus);
- kui tegemist on seguga, selle koostis ja koostisosade suhtelised protsendimäärad;

lahusti/kandeaine:

- tunnusandmed (puhtus; kontsentratsioon (vajaduse korral); kasutatud ruumala);
- kandeaine valiku põhjendus;

▼ **M3**

katseloomad:

- CBA-liini hiirte allikas;
- loomade mikrobioloogiline staatus, kui see on teada;
- loomade arv ja vanus;
- loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

katsetingimused:

- ATP määramise komplekti tootja, partiinumber ja tootja esitatud kvaliteeditagamise/kvaliteedikontrolli andmed ATP määramise komplekti kohta;
- uuritava aine ettevalmistamise ja annustamise üksikasjad;
- annuse valiku põhjendus (sealhulgas esialgse sõelkatse tulemused, kui see tehti);
- kandeaine ja uuritava aine kontsentratsioonid ning uuritava aine manustatud üldkogus;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);
- annustamis- ja proovivõtukava üksikasjalik kirjeldus;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- kriteeriumid, mille järgi uuringutulemus loeti positiivseks või negatiivseks;
- kõikide katse-eeskirjast kõrvalekaldumiste üksikasjad ja selgitus, kuidas kõrvalekaldumine mõjutab uuringu korraldust ja tulemusi;

usaldusväarsuse kontroll:

- kokkuvõtte viimase usaldusväarsuskontrolli tulemustest, sealhulgas teave kasutatud aine, kontsentratsiooni ja kandeaine kohta;
- katselabori paralleelselt saadud ja/või varasemad positiivse kontrolli ja paralleelse negatiivse (lahusti/kandeaine) kontrolli andmed;
- kui paralleelset positiivse kontrolli katset ei tehtud, siis kõige viimase korrapärase positiivse kontrolli uuringu kuupäev ja laboriaruanne ning aruanne, milles esitatakse labori varasemad positiivse kontrolli andmed, mis põhjendavad paralleelse positiivse kontrolli katse tegematajätmist;

tulemused:

- iga looma mass annustamise alguses ja pärast ettemääratud surmamist; samuti iga katserühma keskvärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga);
- iga looma puhul toksilisuse ilmnemise algus ja nähud, sealhulgas võimalik nahaärritus annustamiskohas;
- iga katselooma surmamise aeg ja tema proovidest ATP mõõtmise aeg;
- tabelina iga üksiku hiire RLU väärtused ja iga katserühma SI väärtused;
- iga katserühma RLU/hiire keskvärtus ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ning iga katserühma võõrväärtuste analüüsi tulemused;

▼ M3

— arvutatud SI ja sobiv hajuvuse näitaja, millega võetakse arvesse eri loomadega saadud tulemuste hajuvust uuritava aine rühmas ja kontrollrühmas;

— annuse-immuunvastuse sõltuvus;

— vajaduse korral statistilised analüüsid;

tulemuste arutelu:

— lühike kommentaar tulemuste, annuse-immuunvastuse sõltuvuse analüüsi ja vajaduse korral statistilise analüüsi kohta ning järeldused selle kohta, kas uuritud ainet tuleks pidada naha sensibilisaatoriks.

KIRJANDUS

- 1) OECD (2010), *Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay*, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt <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. Vt: 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. 10-7551 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: <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. Vt: 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. Vt: <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. Vt: 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. Vt: <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. Vt: <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. Vt: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acetox/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. Vt: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- 37) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E. and Hastings, K.L. (1998), Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *J. Toxicol. Environ. Health*, 53 563–79.
- 38) OECD (2005), *Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment*, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Vt: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

▼ **M3**

1. liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (38).

Võrdlusaine: sensibiliseeriv või muu aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsikalised-keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusoovitavas immuunvastuse tugevuse vahemikus.

Valenegatiiv: aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud negatiivseks või toimetuks, kui see tegelikult on positiivne või sensibiliseeriva toimega.

Valepositiiv: aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud positiivseks või sensibiliseerivat toimet omavaks, kui see tegelikult on negatiivne või sensibiliseeriva toimeteta.

Oht: kahjustava tervise- või ökoloogilise mõju võimalikkus. Kahjustav mõju avaldub üksnes piisaval tasemel kokkupuute puhul.

Laboritevaheline reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad erinevad kvalifitseeritud laborid, kasutades sama katse-eeskirja ja uurides samu uuritavaid aineid, saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelsete ja valideerimisega seotud menetlustega ja see näitab, millisel määral võib uurimismeetodit edukalt üle viia ühest laborist teise (38).

Laborisisene reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad konkreetset katse-eeskirja kasutades saada kordusuuringutes eri aegadel samasuguseid tulemusi (38).

Võõrväärtus: võõrväärtus on katsetulemus, mis oluliselt erineb populatsiooni juhuvalimi muudest väärtustest.

Kvaliteedi tagamine: juhtimisprotsess, mille puhul katsete tegemises osalevatest isikutest sõltumatud isikud hindavad labori katsestandarditest, nõuetest ja tegevuse registreerimise korrast kinnipidamist ning andmeedastuse õigsust.

Usaldusväärsus: mõiste, mis iseloomustab katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärssuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (38).

Naha sensibiliseerimine: immunoloogiline protsess, mis avaldub, kui tundlik olend viiakse paikselt kokkupuutesse keemilise allergeeniga, mis kutsub esile naha immuunvastuse, mis võib areneda kontaktsensibiliseerimiseks.

Stimulatsiooniindeks (SI): arvutatud väärtus, mis näitab uuritava aine võimet tekitada naha sensibiliseerimist ning mis on töödeldud rühmades ja paralleelselt uuritud kandeaine-kontrollrühmas jälgitud lümfotsüütide vohamise näitajate suhtarv.

Uuritav aine (uuritav kemikaal): iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M3****B.51. NAHA SENSIBILISEERIMINE: LOKAALSETE LÜMFISÖLMEDE KATSE: BRDU-ELISA**

SISSEJUHATUS

1. OECD kemikaalide katsetamise juhendeid ja ELi katsemeetodeid vaadatakse korrapäraselt läbi, et võtta arvesse teaduse arengut, muutuvaid regulatiivseid vajadusi ja loomade heaolu. Esialgne katsemeetod (B.42) naha sensibiliseerimise määramiseks hiirtel lokaalsete lümfisõlme katsega (*Local Lymph Node Assay* – LLNA; OECD katsejuhend 429) on läbi vaadatud (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42). LLNA valideerimise üksikasjad ja sellega seotud töö ülevaade on avaldatud (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). LLNA-meetodi järgi kasutatakse lümfotsüütide paljunemise määramiseks radioaktiivse isotoobiga märgistatud tümidüüni või joodi ja seepärast ei saa katset kasutada, kui radioaktiivsete ühendite hankimine, kasutamine või kõrvaldamine tekitab probleeme. LLNA: BrdU-ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA – ensüümimmunosorptsioonanalüüs) on LLNA katse-eeskirja modifikatsioon, milles ei kasutata radioaktiivsust ja lümfotsüütide vohamise mõõtmiseks ELISA-põhise katsesüsteemiga kasutatakse radioaktiivselt märgistamata 5-bromo-2-desoksüüridiini (BrdU, Chemical Abstracts Service'i (CASi) nr 59-14-3). Katsemeetod LLNA: BrdU-ELISA on valideeritud ja läbi vaadatud ning rahvusvaheline sõltumatu teaduslik eksperdiühingu komisjon soovib seda, kuna leiab, et see sobib naha sensibiliseerimist põhjustavate ja mittepõhjustavate kemikaalide kindlakstegemiseks, arvestades teatavaid piiranguid (10, 11, 12). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata katseloomadel kemikaalide (ainete ja segude) võimet sensibiliseerida nahka. Käesoleva lisa peatükis B.6 ja OECD katsejuhendis 406 kasutatakse merisigu, nimelt merisigade maksimeerimise katset ja Buehleri katset (13). LLNAd (käesoleva lisa peatükk B.42, OECD katsejuhendis 429) ja selle kahte radioaktiivsuse kasutamiset versiooni, need on LLNA: BrdU-ELISA (käesoleva lisa peatükk B.51, OECD katsejuhendis 442 B) ja LLNA: DA (käesoleva lisa peatükk B.50, OECD katsejuhendis 442 A), tuleb eelistada meriseakatsetele peatükis B.6, OECD katsejuhendis 406 (13), kuna nendega vähendatakse ja täiustatakse katseloomade kasutamist.
2. Nii nagu LLNA puhul, uuritakse LLNA: BrdU-ELISA katsetes naha sensibiliseerimise induktsioonifaasi ja saadakse kvantitatiivseid andmeid immuunvastuse annusest sõltuvuse hindamiseks. Lisaks kõrvaldab võimalus määrata naha sensibiliseerijaid ilma DNA radioaktiivset märgist kasutamata tööalase kokkupuute radioaktiivsusega ja radioaktiivsete jäätmete probleemi. See omakorda võimaldab naha sensibiliseerijate määramiseks kasutada rohkem hiiri, millega võiks veelgi väheneda merisigade kasutamine (s.o peatükk B.6, OECD katsejuhendis 406) selleks otstarbeks (13).

MÕISTED

3. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. LLNA: BrdU-ELISA on muudetud LLNA-meetod võimalike nahka sensibiliseerivate kemikaalide kindlakstegemiseks, millel on aga teatavad piirangud. See ei tähenda tingimata, et kõikidel juhtudel tuleks kasutada LLNA või merisigadega tehtavate katsete (B.6 ja OECD katsejuhend 406) (13) asemel LLNA: BrdU-ELISAt, vaid pigem, et uuring on sama hea ja seda võib kasutada alternatiivina, mille positiivsed või negatiivsed tulemused üldiselt ei vaja täiendavat kinnitamist (10, 11). Katselabor võtab arvesse kogu uuritava aine kohta kättesaadava teabe enne uuringu tegemist.

▼ M3

Selline teave sisaldab uuritava aine nimetust ja keemilist struktuuri, füüsikalise-keemilisi omadusi, muude ainega *in vitro* või *in vivo* tehtud toksilisuskatsete tulemusi, struktuurilt samalaadsete ainete toksikoloogilisi andmeid. Osutatud teavet tuleb analüüsida, et määrata kindlaks, kas LLNA: BrdU-ELISA sobib kõnealuse aine puhul (arvestades LLNA: BrdU-ELISA sobimatust teatavate piiratud kemikaalitüüpide puhul, vt punkt 5) ning valida sobivad annused.

- LLNA: BrdU-ELISA on *in vivo* meetod ja seetõttu ei lõpeta see loomade kasutamist naha allergilise sensibiliseerimise hindamisel. Sellega on siiski võimalik vähendada katseloomade kasutamist selleks otstarbeks, võrreldes merisigadega tehtavate katsetega (B.6, OECD katsejuhik 406) (13). Lisaks võimaldab LLNA: BrdU-ELISA oluliselt parandada viisi, kuidas loomi kasutatakse naha allergilise sensibiliseerimise määramiseks, kuna erinevalt B.6st ja OECD katsejuhendist 406 ei eelda LLNA: BrdU-ELISA, et naha ärritamisega tekitataks ülitundlikkusreaktsioone. Samuti ei eelda LLNA: BrdU-ELISA adjuvandi kasutamist, nagu seda tehakse merisigadega tehtava maksimeerimiskatse puhul (käesoleva lisa peatükk B.6, 13). Seega vähendab LLNA: BrdU-ELISA loomade kannatust. Hoolimata LLNA: BrdU-ELISA eelistest B.6 või OECD katsejuhendi 406 (13) kohaste katsetega võrreldes on teatud piirangud, mis võivad nõuda B.6 või OECD katsejuhendi 406 kohaste katsete (13) kasutamist (nt teatavate metallide katsetamine, valepositiivid teatavate nahaärritajate puhul (näiteks teatavat tüüpi pindaktiivsed kemikaalid) (6) (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42), uuritavate ainete lahustuvus). Lisaks võib teatavate kemikaalide või ainete puhul, mis sisaldavad segavat toimet avaldada võivaid funktsionaalseid rühmi (15), olla vaja kasutada meriseakatsed (st B.6 või OECD katsejuhend 406 (13)). LLNA puhul kindlaks tehtud piiranguid (1 ja käesoleva lisa peatükk B.42) on peetud kehtivateks ka LLNA: BrdU-ELISA puhul (10). Selliste teadaolevate piirangute arvestamisega peaks LLNA: BrdU-ELISA olema kohaldatav igasuguste kemikaalide uurimiseks, millel ei ole omadusi, mis võiksid mõjutada LLNA: BrdU-ELISAgas saadavate tulemuste õigsust. Lisaks sellele tuleks kaaluda piiripealse positiivse tulemuse võimalust, kui stimulatsiooniindeksi (SI) väärtus tuleb vahemikku 1,6–1,9 (vt punktid 31–32). See tugineb 43 ainest koosnevale valideerimise andmebaasile, milles kasutati SI väärtusi $\geq 1,6$ (vt punkt 6), millest LLNA: BrdU-ELISA võimaldas õigesti kindlaks teha kõik 32 LLNA järgi sensibiliseerijat, kuid mis andis vale tulemuse kahe aine puhul 11st LLNA järgi mitte sensibiliseerivast ainest, mille SI oli 1,6–1,9 (st piiripealsed positiivsed tulemused) (10). Kuid kuna samu andmeid kasutati SI väärtuste kindlaksmääramiseks ja katsemeetodi ennustusvõime arvutamiseks, võivad esitatud tulemused viia tegeliku ennustusvõime ülehindamisele.

KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

- LLNA: BrdU-ELISA põhimõte seisneb selles, et sensibilisaatorid kutsuvad esile lümfotsüütide vohamise lähimates lümfisõlmedes, mis dreenevad uuritava aine pealekandmise paika. Vohamine on võrdeline pealekantud allergeeni annuse ja allergiatekitamisvõimega ning see võimaldab lihtsa meetodiga sensibiliseerimist kvantitatiivselt mõõta. Vohamist mõõdetakse nii, et keskmist vohamist igas katserühmas võrreldakse keskmise vohamisega kandeaine-kontrollrühmas, mille liikmeid on töödeldud üksnes kandeainega (*vehicle treated control* – VC). Määratakse igas uuritava ainega töödeldud rühmas leitud keskmise vohamise ja paralleelselt kandeaine-kontrollrühmas leitud keskmise vohamise

▼ M3

suhtarv, mida nimetatakse stimulsiooniindeksiks (SI); SI peab olema vähemalt 1,6 selleks, et katseaine kui naha võimaliku sensibiliseerija edasine hindamine oleks vajalik. Siin kirjeldatud meetodid põhinevad BrdU-sisalduse mõõtmisel; selle meetodiga mõõdetakse vohavate rakkude arvu suurenemist kõrvalesta dreenvivates lümfisõlmedes. BrdU on tümidiini analoog ja vohavad rakud kasutavad seda DNA sünteesil sarnaselt tümidiiniga. BrdU sisenemist DNAsse mõõdetakse ELISA abil, milles kasutatakse BrdU-spetsiifilist peroksidaasiga märgistatud antikeha. Substraadi lisamisel reageerib peroksidaas substraadiga ning tekib värviline reaktsioonisaadus, mille kogus mõõdetakse neeldumise järgi teataval lainepikkusel, kasutades mikrotiiterplaadi lugejat.

KATSE KIRJELDUS

Loomaliigi valimine

7. Käesoleva katse jaoks valitud liik on hiir. LLNA: BrdU-ELISA valideerimisuuringud tehti ainult CBA/JN-liini hiirtega, mida seepärast peetakse eelistatavaks liiniks (10, 12). Kasutatakse noori täiskasvanud emashiiri, kes ei ole poeginud ega tiined. Katse alguses peaksid loomad olema 8–12 nädalat vanad ning loomade kehamassi varieerumine peaks olema minimaalne ja mitte ületama 20 % keskmisest massist. Võib kasutada ka muid liine ja isasloomi, kui on olemas piisavalt andmeid selle tõendamiseks, et LLNA: BrdU-ELISA immuunvastuses ei ole olulisi liini- ja/või soospetsiifilisi erinevusi.

Pidamis- ja söötmingimused

8. Hiiri tuleks pidada rühmapuurides (16), kui ei esitata nõuetekohast teaduslikku põhjendust üksikpuuris pidamise kasuks. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja soovitatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi puhastamise ajal, on eesmärk hoida see vahemikus 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmisel võib kasutada tavapäraselt labori söödavalikut; joogivee kogust ei piirata.

Loomade ettevalmistamine

9. Loomad valitakse juhuvaliku teel, tähistatakse individuaalse identifitseerimise võimaldamiseks (kuid mitte kõrvamärkidega) ning hoitakse oma puurides vähemalt viis päeva enne annustamise algust, et võimaldada neil kohaneda laboritingimustega. Enne katse alustamist uuritakse kõiki loomi, et neil ei oleks nähtavaid nahakahjustusi.

Annustamislahuste valmistamine

10. Tahke uuritav aine tuleb lahustada või suspenderida lahustis või kandaines ja vajaduse korral lahjendada enne hiire kõrvalestale määrimist. Vedelaid kemikaale võib annustada puhtal kujul või lahjendada enne annustamist. Lahustumatuid keemilisi aineid, näiteks aineid, mida kasutatakse meditsiiniseadmetes, tuleb enne hiire kõrvalestale kandmist sobiva solvendiga tõhusalt ekstraheerida, et teha kindlaks kõik ekstraheeritavad koostisained, mille mõju tuleks uurida. Tuleks kasutada uuritava aine värskeid preparaate, kui ei ole stabiilsusandmetega tõendatud, et säilitamine on lubatav.

Usaldusväarsuse kontroll

11. Positiivse kontrolli kemikaale kasutatakse selleks, et tõendada katsemeetodi vajalikkust tulemuslikkust: sensibiliseerivate uuritavate ainetega, mille puhul immuunvastuse ulatus on hästi kirjeldatud, saadakse õige ja korratav tulemus. Soovitatakse teha paralleelselt positiivse kontrolli katse, kuna see tõendab labori võimet teha iga katse õigesti ning võimaldab hinnata laborisest ja laboritevahelist korratavust ja võrreldavust. Mõned regulatiivasutused nõuavad positiivset kontrolli iga uuringu puhul ja seepärast soovitatakse käesoleva meetodi kasutajatel konsulteerida enne LLNA: BrdU-ELISA tegemist asjakohaste asutustega. Seepärast soovitatakse alati teha paralleelselt positiivse kontrolli katseid, et vältida vajadust teha täiendavaid loomkatseid, et täita nõudeid, mis võivad tekkida perioodilise

▼ **M3**

positiivse kontrolli kasutamise puhul (vt punkt 12). Positiivne kontroll peaks andma positiivse LLNA: BrdU-ELISA immuunvastuse kokkupuute-tasemel, mis eeldatavasti suurendab stimulatsiooniindeksit (SI) 1,6 korda või enam, võrreldes negatiivse kontrollrühmaga. Positiivse kontrolli annus tuleks valida nii, et see ei põhjustaks ulatuslikku nahaärritust või süsteemset mürgitust ja tekitatav mõju oleks korratav, kuid mitte liiga suur (näiteks stimulatsiooniindeksit üle 14 peetakse liiga suureks). Eelistatud positiivse kontrolli ained on 25 % heksüülkaneelaldehüüd (CASi number 101-86-0) ja 25 % eugenool (CASi number 97-53-0) atsetooni-oliiviõli segus (4: 1, v/v). Võib olla olukordi, kus piisavalt põhjendatult võib kasutada muid positiivse kontrolli aineid, mis vastavad eespool esitatud kriteeriumidele.

12. Kuigi igas katses soovitatakse paralleelselt teha katsed ka positiivse kontrolli rühmaga, võib esineda olukordi, kus labori jaoks, milles korrapäraselt (st mitte enam kui kuue kuu järel) tehakse LLNA: BrdU-ELISA ja on olemas varasemate positiivse kontrolli katsete andmebaas, mis tõendab labori võimet saada korratavaid ja õigeid positiivse kontrolli tulemusi, võib sobiv olla perioodiline positiivse kontrolli tegemine (näiteks kuni kuue kuu järel). Vajalikku oskuste taset LLNA: BrdU-ELISA alal võib tõendada vähemalt kümne sõltumatu ja omavahel kooskõlas oleva positiivse kontrolli katsega, mis on tehtud mõistliku ajavahemiku (vähem kui aasta) jooksul.
13. Paralleelset positiivse kontrolli rühma tuleb alati kasutada siis, kui muutub LLNA: BrdU-ELISA läbiviimine (näiteks uued väljaõppe saanud töötajad, katsemeetodi materjalide ja/või reaktiivide muutus, katsemeetodi läbiviimise tehniliste vahendite muutus, uus katseloomade tarnija), ja sellised muutused tuleb laboriprotokollis dokumenteerida. Tuleb analüüsida selliste muutuste mõju varasemate katsetega loodud andmebaasi järjepidevusele ja otsustada, kas on vaja teha uus andmebaas, et dokumenteerida kooskõla varasemate positiivse kontrolli tulemustega.
14. Meetodi kasutajad peaksid teadma, et otsus kasutada positiivset kontrolli perioodiliselt, mitte paralleelselt, mõjutab perioodilise positiivse kontrolli vahepealsel ajal ilma positiivse kontrollita saadud negatiivsete uuringutulemuste adekvaatsust ja vastuvõetavust. Kui perioodilise positiivse kontrolli katses saadakse näiteks valenegatiiv, võib ajavahemikus viimasest vastuvõetavast positiivse kontrolli katsest kuni vastuvõetamatu kontrollkatseteni uuritavate ainetega saadud negatiivsed tulemused panna kahtluse alla. Selliste tulemuste tähendust tuleks hoolikalt analüüsida, kui otsustatakse, kas teha positiivse kontrolli katseid paralleelselt või üksnes perioodiliselt. Mõelda tuleb ka, kuidas kasutada vähem loomi paralleelses positiivse kontrolli rühmas, kui see on teaduslikult põhjendatud ja kui labor tõendab oma varasemate andmetega, et on võimalik kasutada vähem hiiri (17).
15. Kuigi positiivset kontrollainet tuleks uurida kandeaines, mis teatavasti annab teatava kindla immuunvastuse (nt atsetoon-oliiviõli, suhtes 4: 1, v/v), võib esineda teatavaid regulatiivseid olukordi, milles on vaja teha katseid ka ebatavalise kandeainega (kliiniliselt või keemiliselt asjakohane segu) (18). Kui paralleelset positiivse kontrolli katset tehakse muu kandeainega kui uuritava aine puhul, on vaja moodustada eraldi veel positiivse kontrolli kandeaine-kontrollrühm.

▼ **M3**

16. Kui uuritakse teatava keemiliste ühendite klassi aineid või mõõdetakse nende poolt esile kutsutava immuunvastuse vahemikku, võib olla kasulik mõõta teatavaid võrdlusaineid, millega tõendatakse, et katse võimaldab õigesti määrata kõnealuste ühenditüüpide võimet nahka sensibiliseerida. Sobival võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused:

— struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega;

— teadaolevad füüsikalised ja keemilised omadused;

— varasemad toetavad LLNA: BrdU-ELISA andmed;

— toetavad andmed muude katseloomade ja/või inimese kohta.

KATSE KÄIK**Loomade arv ja annusemäärad**

17. Ühes annuserühmas on vähemalt neli looma, kasutatakse vähemalt kolme uuritava aine kontsentratsiooni ja paralleelselt negatiivset kontrollrühma, keda töödeldakse üksnes kandainega, mida kasutatakse uuritava aine puhul, ning positiivse kontrolli rühma (kas paralleelne või hiljutine positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15). Tuleb kaaluda positiivse kontrolli tegemist mitme annusega, eriti kui positiivset kontrolli tehakse aeg-ajalt. Kontrollrühma loomi koheldakse ja töödeldakse nii nagu katserühma loomi, välja arvatud töötlemine uuritava ainega.
18. Annuse ja kandaine valik peaks põhinema viidetes 2 ja 19 antud soovitusel. Tavaliselt valitakse järjestikused annused sobivast kontsentratsioonide reast, näiteks 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2,5 %, 1 %, 0,5 % jne. Kasutatava kontsentratsioonide rea valimisel peaks olema asjakohane teaduslik põhjendus. Tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad toksikoloogiaandmed (nt ägeda toksilisuse ja nahaärrituse kohta) ning andmed uuritava aine struktuuri ja füüsikalise-keemiliste omaduste kohta ning valida kolm järjestikust kontsentratsiooni nii, et suurim kontsentratsioon tagab maksimaalse võimaliku kokkupuute, kuid selle puhul ei avaldu süsteemset toksilisust ega liiga suurt paikset nahaärritust (19, 20 ja käesoleva lisa peatükk B.4). Sellise teabe puudumisel võib olla vajalik teha esialgne sõelkatse (vt punktid 21–24).
19. Kandaine ei tohiks segada katse tegemist ega muuta katse tulemust ja tuleks valida nii, et viia lahustuvus maksimumini, et kasutada suurimat võimalikku kontsentratsiooni ja saada ühtlasi uuritava aine pealekandmiseks sobiv lahus või suspensioon. Soovitavad kandained on atsetoon-oliiviõli (4: 1, v/v), *N,N*-dimetüülformamiid, metüületüülketoon, propüleenglükool ja dimetüülsulfoksiid (6), kuid võib kasutada ka muid kandaineid, kui esitada selleks piisav teaduslik põhjendus. Teatud olukorras võib osutada vajalikuks kasutada täiendavaks kontrolliks kliiniliselt asjakohast lahustit või kaubanduslikku valmistist, milles uuritavat ainet turustatakse. Tuleks jälgida, et hüdrofiilsed uuritavad ained kantaks peale kandainesüsteemi abil, mis märgab nahka ega voola nahalt kohe maha; selleks lisatakse sobivaid solubiliseerijaid (nt 1 % Pluronic® L92). Seepärast tuleks täielikku vesilahust vältida.

▼ **M3**

20. Iga üksiku hiire lümfisõlmede töötlemine võimaldab hinnata loomadevahelist varieeruvust ja statistiliselt võrrelda uuritavate ainete tehtud mõõtmiste ja kandeaine-kontrollrühma mõõtmiste erinevust (vt punkt 33). Lisaks saab positiivse kontrolli rühma hiirte arvu vähendamise võimalikkust hinnata siis, kui kogutakse iga üksiku hiire andmeid (17). Lisaks nõuavad mõned reguleerivad asutused iga üksiku looma andmete kogumist. Üksikuid loomi käsitlevate andmete korrapärane kogumine annab loomade heaoluga seotud eelise, kuna võimaldab vältida korduvate uuringute tegemist, mis oleks hädavajalik, kui uuritavate ainete tulemusi, mis algselt on kogutud ühel viisil (näiteks loomade andmete ühendamise), peaks reguleeriv asutus hiljem vaatlema teiste nõuete alusel (näiteks üksikloomade andmete põhjal).

Esialgne sõelkatse

21. Kui ei ole andmeid suurima uuritava annuse kindlaksmääramiseks (vt punkt 18), tuleks teha esialgne sõelkatse, et leida LLNA: BrdU-ELISA jaoks sobiv annuste vahemik. Esialgse sõelkatse eesmärk on saada andmeid, mille järgi määrata suurim LLNA: BrdU-ELISA põhikatses kasutatav annus, kui ei ole teada kontsentratsioon, mille avaldub süsteemne toksilisus (vt punkt 24) ja/või tekib ülemäärane nahaärritus (vt punkt 23). Suurim uuritav annus peab olema 100 % kontsentratsioon vedela katseaine puhul või suurim võimalik kontsentratsioon tahke aine või suspensiooni puhul.
22. Esialgne sõelkatse tehakse samades tingimustes kui LLNA: BrdU-ELISA põhikatses, kuid ei hinnata lümfisõlmede vohamist ja annuserühma kohta võidakse kasutada vähem katseloomi. Annuserühmas on soovitatavalt üks või kaks hiirt. Kõiki hiiri vaadeldakse iga päev, et leida süsteemse toksilisuse kliinilisi ilminguid või paikset nahaärritust pealekandmiskohas. Registreeritakse kehakaal enne katset ja enne katse lõppu (6. päev). Iga hiire kumbagi kõrva uuritakse punetuse suhtes ja hinnatakse selle aste, kasutades tabelit 1 (20, ja käesoleva lisa peatükk B.4). Kõrvalesta paksust mõõdetakse paksusemõõtja (nt digitaalne mikromeeter või paksusemõõtja Peacock Dial) abil 1. päeval (enne annustamist), 3. päeval (ligikaudu 48 tundi pärast esimest annust) ja 6. päeval. Lisaks võib 6. päeval mõõta kõrva paksuse, milleks pärast looma humaanset surmamist lüüakse kõrvalestast mulgustajaga välja tükk ja kaalutakse. Ulatuslikku paikset nahaärritust näitab vähemalt hindele 3 vastav punetus ja/või kõrvalesta paksuse suurenemine vähemalt 25 % mõnel mõõtmispäeval (21, 22). LLNA: BrdU-ELISA põhikatses jaoks valitud suurim annus on järgmine väiksem annus esialgse sõelkatse kontsentratsioonide reas (vt punkt 18), millel ei avaldu süsteemne toksilisus ega teki ülemääraast nahaärritust.

Tabel 1

Punetuse hinne

Nähud	Hinne
Nahapunetust ei esine	0
Väga nõrk (vaevumärgatav) nahapunetus	1
Selgesti nähtav nahapunetus	2

▼ **M3**

Nähud	Hinne
Mõõdukas kuni tugev nahapunetus	3
Tugev nahapunetus (meenutab peeti) kuni kooriku tekkimine, mis takistab nahapunetuse astme edasist täpsustamist	4

23. Lisaks kõrvalesta 25 % suurenemisele (21, 22) on ärritust tekitavate ainete kindlakstegemiseks LLNA abil kasutatud ka kõrvalesta paksuse statistiliselt olulist suurenemist töödeldud hiirtel, võrreldes kontrollrühma hiirtega (22, 23, 24, 25, 26, 27, 28). Ent kuigi statistiliselt oluline kõrvalesta paksuse suurenemine võib olla ka väiksem kui 25 %, ei ole selline paksuse suurenemine konkreetselt seotud ülemäärase nahaärritusega (25, 26, 27, 28, 29).
24. Kui kliinilisi uuringuid kasutatakse LLNA: BrdU-ELISA põhikatses kasutatava suurima annuse hindamise osana, siis süsteemset toksilisust (30) võivad näidata järgmised kliinilised tunnused: närvisüsteemi talitluse muutused (nt karva püstitõusmine, liigutuste koordineerimise kadu, värin ja krampid), käitumise muutused (nt agressiivsus, muutus oma karvkatte hooldamises, liikumisaktiivsuse oluline muutus), hingamise muutused (s.o hingamissageduse ja -sügavuse muutused, nagu raskendatud hingamine, õhuahmimine, räginad) ning muutused toidu ja vee tarbimises. Lisaks tuleb hindamisel arvestada letargia ja/või mittereageerimise märke ning rohkem kui kerge või lühiajalise valu või ebamugavustunde kliinilisi tunnuseid, samuti rohkem kui 5 % kehakaalu vähenemist ajavahemikus 1. kuni 6. päevani ning suremust. Suremas olevad loomad ja loomad, kes näitavad suure valu või kannatuste tunnuseid, tuleks humaanselt surmata (31).

Põhiuuringu katse ajakava

25. Katse ajakava on järgmine.
- *1. päev:* määratakse iga üksiku looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Kummagi kõrva välisküljele kantakse 25 µl sobivalt lahjendatud uuritavat ainet, üksnes kandeainet või positiivse kontrolli ainet (paralleelne või perioodiline positiivne kontroll, olenevalt labori valikust, arvestades punkte 11–15).
 - *2. ja 3. päev:* korratakse 1. päeval tehtud pealekandmist.
 - *4. päev:* loomi ei töödelda.
 - *5. päev:* hiire kõhukelmesse süstitakse 0,5 ml (5 mg hiire kohta) BrdU lahust (10 mg/ml).
 - *6. päev:* määratakse iga looma mass ja registreeritakse koos kõigi võimalike kliiniliste tähelepanekutega. Umbes 24 tundi pärast BrdU süsti surmatakse loomad humaanselt. Igal hiirel lõigatakse välja kumbagi kõrvalesta drenivad lümfisõlmed ja töödeldakse eraldi iga hiire lümfisõlme fosfaatpuhvriga soolalahuses. Lümfisõlmede leidmise ja väljalõikamise üksikasjad ja joonised on esitatud viites 17. Paiksete naha immuunvastuste edasiseks jälgimiseks põhikatses võib katseprotokollis anda ka täiendavad näitajad, nagu kõrvalesta punetuse hinnang või kõrvalesta paksuse mõõtmise andmed (mis saadakse kas paksusemõõtjaga või pärast surmamist kõrvalestast mulgustajaga välja löödud tüki massi mõõtmisega).

▼ **M3****Rakususpensioonide valmistamine**

26. Valmistatakse iga looma mõlemalt poolt välja lõigatud ühendatud lümfisõlmede üksikrakususpensioon, milleks rakud eraldatakse üksteisest ettevaatliku mehaanilise töötlemisega, filtrides läbi 200 µm avaga roostevabast terasest võrgu, või kasutatakse üksikrakususpensiooni valmistamiseks muud sobivat võtet (näiteks purustatakse lümfisõlmed ühekordselt kasutatava plastikuhmrinuiaga ja lastakse seejärel läbi nailonvõrgu avasuurusega nr 70). Lümfisõlmerakkude suspensiooni valmistamine on selle katse puhul otsustava tähtsusega ja meetodika iga kasutaja peaks eelnevalt omandama selle oskuse. Negatiivse kontrolli loomade lümfisõlmed on väikesed, seepärast on tähtis tegutseda ettevaatlikult, et vältida igasugust kõrvalist mõju SI väärtustele. Igal juhul tuleb lümfisõlmerakkude suspensiooni lõppruumala viia kindlaksmääratud optimeeritud ruumalani (ligikaudu 15 ml). Optimeeritud ruumala määratakse nii, et negatiivse kontrolli rühmas saavutataks keskmine optiline neeldumine (tihedus) vahemikus 0,1–0,2.

Rakkude vohamise määramine (BrDU sisalduse mõõtmine lümfotsüütide DNAs)

27. BrDU määratakse ELISA meetodiga, kasutades müügil olevat komplekti (näiteks Roche Applied Science, Mannheim, Saksamaa, katalooginumber 11 647 229 001). Lühidalt, 100 µl lümfisõlmerakkude suspensiooni kantakse kolme lamedapõhjalise mikrotiiterplaadi süvendisse. Lümfisõlmerakud fikseeritakse ja denatureeritakse ning lisatakse siis igasse süvendisse BrDU-vastaseid antikehi. Seejärel eemaldatakse BrDU-vastased antikehad pesemisega ja lisatakse substraadi lahus ning lastakse tekkida kromogeenil. Määratakse optiline neeldumine 370 nm juures võrdluslainepikkuse 492 nm suhtes. Kõigil juhtudel on katsetingimusi vaja optimeerida (vt punkt 26).

TÄHELEPANEKUD**Kliinilised tähelepanekud**

28. Vähemalt kord päevas tuleks igal loomal hoolikalt vaadelda kliiniliste tunnuste esinemist – kas annustamiskoha paikset ärritust või süsteemset toksilisust. Iga hiire kohta registreeritakse süstemaatiliselt kõik tähelepanekud. Jälgimiskavas tuleks ette näha kriteeriumid, mille alusel tehakse kiiresti kindlaks ja surmatakse valutult hiired, kellel avaldub süsteemne toksilisus, ülemäärane paikne nahaärritus või -söövitus (31).

Kehamass

29. Vastavalt punktile 25 tuleks mõõta iga looma kehamass katse alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist.

TULEMUSTE ARVUTAMINE

30. Iga katserühma tulemused väljendatakse keskmise stimulatsiooniindeksi (SI) kaudu. SI leidmiseks jagatakse iga uuritava aine rühma ja positiivse kontrollrühma keskmine BrDU-märgistusindeks hiire kohta lahusti-/kandeaine-kontrollrühma keskmise BrDU-märgistusindeksiga hiire kohta. Keskmine SI kandeaine-kontrollrühmade puhul on seega 1.

BrDU-märgistusindeks on määratletud järgmiselt:

$$\text{BrDU-märgistusindeks} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS tühikatse}_{\text{em}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS tühikatse}_{\text{ref}}),$$

kus: em = emissioonlainepikkus ja ref = võrdluslainepikkus.

▼ **M3**

31. Otsustamisel peetakse tulemust positiivseks, kui SI on vähemalt 1,6 (10). Kuid piiripealse tulemuse (SI väärtus vahemikus 1,6–1,9) positiivseks leiuks kuulutamise otsuse tegemisel võib kasutada ka annuse-immuunvastuse sõltuvuse tugevust, statistilist olulisust ja lahusti/kandeaine ning positiivse kontrolli tulemuste kooskõlalisust (3, 6, 32).
32. Kui SI on vahemikus 1,6–1,9, st tegemist on piiripealse positiivse tulemusega, võivad meetodi kasutajad võtta koos SI väärtusega arvesse sellist lisateavet nagu annuse-immuunvastuse sõltuvus, tõendid süsteemse toksilisuse või ülemäärase ärrituse kohta ja vajaduse korral statistilist olulisust, mis kinnitavad positiivset tulemust (10). Arvesse tuleks võtta ka uuritava aine mitmesuguseid omadusi, sealhulgas struktuurilist sarnasust teadaolevate naha sensibilsaatoritega, omadust põhjustada hiirel tugevat paikset nahaärritust ning annuse-immuunvastuse sõltuvuse laadi. Neid ja muid kaalutlusi on arutatud üksikasjalikult viites 4.
33. Andmete kogumine üksiku hiire tasandil võimaldab statistiliselt analüüsida, kas andmetes on näha annuse-immuunvastuse vahelist sõltuvust ja kui tugev see on. Iga statistiline hindamine peaks hõlmama annuse-immuunvastuse sõltuvuse hindamist ja katserühmade läbimõeldud võrdlemist (näiteks paari- viisiline annuserühmade ja paralleelsete lahuse-/kandeaine-kontrollrühmade võrdlemine). Statistiline analüüs võib hõlmata näiteks lineaarset regressiooni või Williami testi annuse-immuunvastuse sõltuvuste hindamiseks ja Dunnetti paari- viisiliste võrdluste testi. Statistilise analüüsi sobiva meetodi valimisel peaks uurija kogu aeg arvesse võtma võimalikku dispersioonide ebavõrdsust ja muid seonduvaid probleeme, mille tõttu võib vaja minna andmete teisendamist või mitteparameetrilist statistilist analüüsi. Igal juhul võib uurijal olla vaja teha SI arvutusi ja statistilist analüüsi kõigi andmepunktidega ja siis mõne andmepunkti kõrvalejätmisega (nn võõrväärtused).

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmed**

34. Andmed tuleks kokku võtta tabeli vormis; tabelis esitatakse iga üksiklooma BrdU-märgistusindeksi väärtused, rühma keskmine suhte BrdU-märgistusindeks/katseloom väärtus, selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ja iga annuserühma keskmine SI, võrrelduna paralleelse lahusti-/kandeaine-kontrollrühma SI-ga.

Katsearuanne

35. Katsearuandes esitatakse järgmine teave:

uuritavad kemikaalid ja kontrollkemikaalid:

— tunnusandmed (näiteks CASi ja EÜ numbrid, kui on teada; allikas; puhtus; teadaolevad lisandid; partii number);

— füüsikaline laad ja füüsikalised-keemilised omadused (nt lenduvus, stabiilsus, lahustuvus);

— kui tegemist on seguga, selle koostis ja koostisosade suhtelised protsendimäärad;

lahusti/kandeaine:

— tunnusandmed (puhtus; kontsentratsioon (vajaduse korral); kasutatud ruumala);

— kandeaine valiku põhjendus.

▼ **M3**

katseloomad:

- CBA-liini hiirte allikas;
- loomade mikrobioloogiline staatus, kui see on teada;
- loomade arv ja vanus;
- loomade päritolu, pidamistingimused, söötmine jne;

katsetingimused:

- ELISA määramise komplekti tootja, partiinumber ja tootja esitatud kvaliteeditagamise/kvaliteedikontrolli andmed komplekti kohta (antikeha tundlikkus ja spetsiifilisus ning määramispiir);
- uuritava aine ettevalmistamise ja annustamise üksikasjad;
- annuse valiku põhjendus (sealhulgas esialgse sõelkatse tulemused, kui see tehti);
- kandeaine ja uuritava aine kontsentratsioonid ning uuritava aine manustatud üldkogus;
- toidu ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas);
- annustamis- ja proovivõtukava üksikasjalik kirjeldus;
- toksilisuse mõõtmise meetodid;
- kriteeriumid, mille järgi uuringutulemus loeti positiivseks või negatiivseks;
- kõikide katse-eeskirjast kõrvalekaldumiste üksikasjad ja selgitus, kuidas kõrvalekaldumine mõjutab uuringu korraldust ja tulemusi;

usaldusväärsuse kontroll:

- kokkuvõtte viimase usaldusväärsuskontrolli tulemustest, sealhulgas teave kasutatud aine, kontsentratsiooni ja kandeaine kohta;
- katselabori paralleelselt saadud ja/või varasemad positiivse kontrolli ja paralleelse negatiivse (lahusti/kandeaine) kontrolli andmed;
- kui paralleelset positiivse kontrolli katset ei tehtud, siis kõige viimase korrapärase positiivse kontrolli uuringu kuupäev ja laboriaruanne ning aruanne, milles esitatakse labori varasemad positiivse kontrolli andmed, mis põhjendavad paralleelse positiivse kontrolli katse tegematajättmist;

tulemused:

- iga looma mass annustamise alguses ja pärast ettemääratud humaanset surmamist; samuti iga katserühma keskväärts ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga);
- iga looma puhul toksilisuse ilmnemise algus ja nähud, sealhulgas võimalik nahaärritus annustamiskohas;
- tabelina iga üksiku hiire BrdU-märgistusindeksi väärtused ja iga katserühma SI väärtused;
- iga katserühma BrdU-märgistusindeksi/hiire keskväärts ja selle viga (näiteks standardhälve, standardviga) ning iga katserühma võõrväärtuste analüüsi tulemused;

▼ **M3**

— arvutatud SI ja sobiv hajuvuse näitaja, millega võetakse arvesse eri loomadega saadud tulemuste hajuvust uuritava aine rühmas ja kontrollrühmas;

— annuse-immuunvastuse sõltuvus;

— vajaduse korral statistilised analüüsid;

tulemuste arutelu:

— lühike kommentaar tulemuste, annuse-immuunvastuse sõltuvuse analüüsi ja vajaduse korral statistilise analüüsi kohta ning järeldused selle kohta, kas uuritud ainet tuleks pidada naha sensibilisaatoriks.

KIRJANDUS

- 1) OECD (2010), Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay, Test Guideline No. 429, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. Vt: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- 2) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996), The local lymph node assay: status of validation. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 999-1002.
- 3) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E. (1996), The local lymph node assay: A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 34, 985-997.
- 4) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998), Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 327-33.
- 5) Van Och, F.M.M., Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J. and Van Loveren, H. (2000), A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicol.*, 146, 49-59.
- 6) ICCVAM (1999), The murine local lymph node Assay: A test method for assessing the allergic contact dermatitis potential of chemicals/compounds: The results of an independent peer review evaluation coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99-4494. Research Triangle Park, N.C. Vt: 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. 10-7552 A/B. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. Vt: <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. Vt: 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. Vt: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>
- 14) Kreiling, R., Hollnagel, H.M., Hareng, L., Eigler, L., Lee, M.S., Griem, P., Dreesen, 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. Vt: 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. Vt: <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. Vt: <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. Vt: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acute/tox/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. Vt: <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. Health*, 53, 563–79.
- 33) OECD (2005), Guidance Document on the Validation and International Acceptance of New or Updated Test Methods for Hazard Assessment, Environment, Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 34, ENV/JM/MONO(2005)14, OECD, Paris. Vt: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>

▼ **M3**

1. liide

MÕISTED

Täpsus: katsemeetodi tulemuste ja kinnitatud võrdlusväärtuste kooskõla määr. Täpsus näitab katsemeetodi tulemuslikkust ja on üks asjakohastest aspektidest. Seda terminit kasutatakse ka vastavuse tähenduses ja see näitab, kui sageli annab katsemeetod õige tulemuse (33).

Võrdlusaine: sensibiliseeriv või muu aine, mida kasutatakse standardina võrdlemiseks uuritava ainega. Võrdlusainel peaksid olema järgmised omadused: i) pidev ja usaldusväärne tarnija; ii) struktuuriline ja funktsionaalne sarnasus uuritava ainega; iii) teadaolevad füüsilised ja keemilised omadused; iv) täiendavad andmed teadaolevate mõjude kohta ja v) teadaolev mõjusoo soovitas mõju tugevuse vahemikus.

Valenegatiiv: uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud negatiivseks või toimetuks, kui see tegelikult on positiivne või sensibiliseeriva toimega (33).

Valepositiiv: uuritav aine, mis on katsemeetodiga ekslikult tunnistatud positiivseks või sensibiliseerivat toimet omavaks, kui see tegelikult on negatiivne või sensibiliseeriva toimeteta (33).

Oht: kahjustava tervise- või ökoloogilise mõju võimalikkus. Kahjustav mõju avaldub üksnes piisaval tasemel kokkupuute puhul.

Laboritevaheline reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad erinevad kvalifitseeritud laborid, kasutades sama katse-eeskirja ja uurides sama ainet, saada kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt sarnaseid tulemusi. Laboritevaheline reprodutseeritavus määratakse valideerimiseelsete ja valideerimisega seotud menetlustega ja see näitab, millisel määral võib uurimismeetodit edukalt üle viia ühest laborist teise (33).

Laborisisene reprodutseeritavus: suurus, mis näitab, millisel määral suudavad sama labori kvalifitseeritud töötajad konkreetset katse-eeskirja kasutades saada kordusuuringutes eri aegadel samasuguseid tulemusi (33).

Võõrväärtus: võõrväärtus on katsetulemus, mis oluliselt erineb populatsiooni juhuvalimi muudest väärtustest.

Kvaliteedi tagamine: juhtimisprotsess, mille puhul katsete tegemises osalevatest isikutest sõltumatud isikud hindavad labori katsestandarditest, nõuetest ja tegevuse registreerimise korrast kinnipidamist ning andmeedastuse õigsust.

Usaldusväärsus: mõiste, mis iseloomustab katsemeetodi tulemuste reprodutseeritavust, kui meetodit rakendatakse ühe ja sama katse-eeskirja alusel ühes laboris ja eri laborites pikema aja jooksul. Usaldusväärssuse hindamiseks arvutatakse laborisisene ja laboritevaheline reprodutseeritavus (33).

Naha sensibiliseerimine: immunoloogiline protsess, mis avaldub, kui tundlik olend viiakse paikselt kokkupuutesse keemilise allergeeniga, mis kutsub esile naha immuunvastuse, mis võib areneda kontaktsensibiliseerimiseks.

Stimulatsiooniindeks (SI): arvutatud väärtus, mis näitab uuritava aine võimet tekitada naha sensibiliseerimist ning mis on töödeldud rühmades ja paralleelselt uuritud kandeaine-kontrollrühmas jälgitud lümfotsüütide vohamise näitajate suhtarv.

Uuritav aine (uuritav kemikaal): iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M4****B.52. ÄGE MÜRGISUS SISSEHINGAMISEL – ÄGEDA MÜRGISUSE
KLASSI MÄÄRAMISE MEETOD**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga (*Test Guideline*, TG) 436 (2009). Esimene sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse katsejuhend nr 403 võeti vastu 1981. aastal ja see on hiljem läbi vaadatud (vt käesoleva lisa peatükk B.2 (1)). Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse klassi (*Acute Toxic Class*, ATC) määramise meetodi koostamist (2, 3, 4) peeti asjakohaseks pärast läbivaadatud ägeda suukaudse mürgisusastme meetodi vastuvõtmist (käesoleva lisa peatükk B.1b) (5). Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse klassi määramise meetodi tulemuslikkuse tagantjärele hindamine näitas, et kõnealune meetod on sobiv kasutamiseks klassifitseerimise ja märgistamise eesmärgil (6). Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse klassi määramise meetod võimaldab kasutada kindlaksmääratud sihtkontsentratsioonide mitut etappi, et määrata uuritava kemikaali mürgisuse klass. Peamise näitajana kasutatakse letaalsust, kuid suurtes valudes, kannatustes, piinlevad või suuremas olemas loomad tuleks kannatuste minimeerimiseks humaansel viisil surmata. Humaansete lõpetamiskriteeriumide suunised on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19 (7).
2. Käesoleva katsemeetodi kasutamise ja tõlgendamise suunised on esitatud sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse katset käsitlevas juhenddokumendis nr 39 (8).
3. Käesoleva katsemeetodi kontekstis kasutatud mõisted on esitatud 1. liites ja juhenddokumendis nr 39 (8).
4. Katsemeetod annab teavet ohtlike omaduste kohta ning võimaldab reastada ja klassifitseerida uuritava kemikaali vastavalt ägedat mürgisust põhjustavate kemikaalide klassifitseerimist käsitlevale määrusele (EÜ) nr 1272/2008 (9). Kui on vajalikud LC₅₀ punktväärtuste hinnangud või mõju kontsentratsioonist sõltuvuse analüüsid, on asjakohane kasutada käesoleva lisa peatükis B.2 (1) esitatud meetodit. Täpsemad suunised katsemeetodi valiku kohta on esitatud juhenddokumendis nr 39 (8). Käesolev katsemeetod ei ole spetsiaalselt ette nähtud erimaterjalide, nagu vähe lahustuvad isomeetriselised või kiudmaterjalid või toodetud nanomaterjalid, uurimiseks.

LÄHTEKAALUTLUSED

5. Enne käesoleva katsemeetodi kohase katse tegemist peaks uurimislabor läbi vaatama kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta, sh tehtud uuringud, mille andmete abil oleks võimalik täiendada katse tegemisest loobuda, et minimeerida loomade kasutust. Teave, mis võib aidata valida katseks kõige sobivama liigi, liini, soo, kokkupuuteviisi ja sobivad uuritavad kontsentratsioonid, hõlmab järgmist: uuritava kemikaali keemiline nimetus, struktuur ja füüsikalised-keemilised omadused; mis tahes *in vitro* või *in vivo* mürgisuse katsete tulemused; eeldatavad kasutusvaldkonnad ja inimestega kokkupuute võimalused; olemasolevad (kvantitatiivsete) struktuuri-aktiivsuse sõltuvuste ((Q)SAR) andmed ja toksikoloogilised andmed samalaadse struktuuri ainete kohta. Kontsentratsioone, mis eeldatavasti tekitavad söövitava⁽¹⁾ või tugevasti ärritava toime tõttu tugevat valu ja kannatusi, ei tohiks käesoleva katsemeetodiga katsetada (vt juhenddokument nr 39 (8)).

⁽¹⁾ Söövitavuse hindamiseks võib kasutada eksperdiarvamust ja järgmisi tõendeid: inimeste ja loomadega saadud kogemused, olemasolevad (*in vitro*) andmed, näiteks käesoleva lisa peatükk B.40 (10), B.40a (11) või OECD katsejuhend nr 435 (12), pH-väärtused, teave samalaadsete kemikaalide kohta või mis tahes muud asjakohased andmed.

▼ **M4****KATSE PÕHIMÕTE**

6. Katse seisneb selles, et astmelise meetodiga kogutakse neljatunnise kokkupuute jooksul uuritava kemikaali sissehingamisel tekkiva ägeda mürgisuse kohta piisavalt teavet aine klassifitseerimiseks. Konkreetse regulatiivse eesmärgi jaoks võib kasutada muid kokkupuute ajavahemikke. Igal ettenähtud kontsentratsiooni etapil tehakse katse kolme loomaga kummaski soost. Olenevalt loomade suremisest ja/või sellest, kas loomad on suremas, võib uuritava kemikaali ägeda mürgisuse hindamiseks piisata kahest etapist. Kui esitatakse tõendid, et üks sugu on tundlikum kui teine, võib katset jätkata ainult sellest soost loomadega, kumb on tundlikum. Järgmine etapp määratakse kindlaks eelmise etapi tulemusega, nii et
 - a) lisakatseid ei ole vaja teha;
 - b) katse tehakse kolme loomaga kummagi soo kohta või
 - c) kuue sellest soost loomaga, kumb on tundlikum, s.o mürgisusklassi alampiiri hinnangud peaksid põhinema kuuel loomal uuritava kontsentratsiooni rühma kohta nende soost olenemata.
7. Suremas loomad või loomad, kes ilmselgelt kannatavad valu või kellel ilmnevad raskete ja kestvate kannatuste tunnused, tuleks humaansel viisil surmata; selliseid loomi võetakse katsetulemuste tõlgendamisel arvesse samamoodi kui katse käigus surnud loomi. Kriteeriumid, mille põhjal tehakse suremas oleva või raskelt kannatava looma surmamise otsus, ja juhused prognoositava või läheneva surma kindlakstegemiseks on esitatud humaansed lõpetamiskriteeriume käsitlevas juhenddokumendis nr 19 (7).

MEETODI KIRJELDUS**Loomaliigi valimine**

8. Tuleks kasutada katseloomade enim kasutatavate laboriliinide noori terveid täiskasvanud isendeid. Eelistatav loomaliik on rott; muude liikide kasutamise korral tuleks seda põhjendada.

Loomade ettevalmistamine

9. Emasloomad ei tohiks olla poeginud ega tiined. Kokkupuute päeval peaksid loomad olema 8 kuni 12 nädala vanused noored täiskasvanud, kelle kehamass ei tohiks erineda rohkem kui $\pm 20\%$ selliste samas vanuses ja samast soost loomade keskmisest kehamassist, keda kasutati varasemates kemikaaliga kokkupuute katsetes. Loomad valitakse juhuslikult ja märgistatakse individuaalselt. Loomi hoitakse oma puuris vähemalt viis päeva enne katse algust, et võimaldada neil laboritingimustega kohaneda. Loomad peaksid olema enne katset ka katseseadmetega lühikese aja vältel kohanenud, kuna sel viisil vähendatakse uude keskkonda viimisest põhjustatud stressi.

Pidamistingimused

10. Katseloomade pidamise ruumi temperatuur peaks olema 22 ± 3 °C. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuigi see ei pruugi olla võimalik, kui kandeainena kasutatakse vett. Enne ja pärast kokkupuudet tuleks loomad tavaliselt paigutada soo ja kontsentratsiooni alusel rühmitatuna puuridesse, kuid loomade arv puuris ei tohiks segada iga looma täpset jälgimist ning peaks minimeerima loomade suremist kannibalismi ja võitlemise tõttu. Kui loomade kokkupuute toimub ainult nina kaudu, siis võib olla vajalik lasta neil hoiutorudega kohaneda. Hoiutorud ei tohiks põhjustada loomadele üleareuseid füüsilisi, soojusest või piiratud liikumisvõimest tingitud ebamugavusi. Loomade liikumise piiramine võib mõjutada füsioloogilisi näitajaid, näiteks kehatemperatuuri (hüpertermia) ja/või hingamise

▼ **M4**

minutimahtu. Kui on kättesaadavad üldandmed, mille kohaselt kõnealuseid muutusi märkimisväärses ulatuses ei teki, ei ole eelnev hoiutoruga kohane mine vajalik. Kogu keha kaudu aerosooliga kokku puutuvaid loomi tuleks kokkupuute ajal eraldi hoida, et vältida loomadepoolset uuritava aerosooli filtrimist läbi oma puurikaaslaste karvkatte. Võib kasutada tavalisi ja sertifitseeritud laborisöötasid, v.a kokkupuute ajal, ning anda piiramatul koguses kraanivett. Valgustus peaks olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.

Inhalatsioonikambriid

11. Inhalatsioonikambri valimisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali laadi ja katse eesmärki. Eelistatav kokkupuuteviis on ainult nina kaudu (mis hõlmab ainult pea, nina või koonu kaudu kokkupuudet). Ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet eelistatakse üldiselt vedelik- või pulberaerosooli ja aerosooliks kondenseeruda võiva auruga tehtavate uuringute puhul. Uuringu eesmärgi saavutamiseks võib parem olla kokkupuude kogu keha kaudu, kuid seda tuleks katseprotokollis põhjendada. Kogukehakambri kasutamise korral keskkonna stabiilsuse tagamiseks ei tohiks katseloomade kogumaht ületada 5 % kambri mahust. Ainult nina ja kogu keha kaudu kokkupuute tehnilisi põhimõtteid ning konkreetseid eeliseid ja puudujääke on kirjeldatud juhend-dokumendis nr 39 (8).

KOKKUPUUTETINGIMUSED**Kontsentratsioonide manustamine**

12. Soovitatakse kasutada fikseeritud neljatunnist kokkupuuteaega, arvestamata tasakaalustamisega. Muu kestus võib olla vajalik erinõuete täitmiseks, kuid selle kasutamist tuleks uuringuprotokollis põhjendada (vt juhenddokument nr 39 (8)). Kogukehakambri uuritava kemikaaliga kokku puutuvad loomad tuleks eraldi paigutada, et vältida puurikaaslaste karvkatte korrastamise tõttu selle suukaudset manustamist. Kokkupuute ajal ei tohiks loomi sööta. Kogu keha kaudu toimuva kokkupuute ajal võib loomadele anda vett.
13. Loomad viiakse kokkupuutesse uuritava kemikaaliga, mis on gaas, aur, aerosool või nende segu. Katses kasutatav füüsikaline olek sõltub uuritava kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest, valitud kontsentratsioonist ja/või uuritava kemikaali kõige tõenäolisemast füüsikalisest vormist käsitsemise ja kasutamise ajal. Hügrokoopseid ja väga reaktsioonivõimelisi uuritavaid kemikaale tuleks katsetada kuiva õhu tingimustes. Tuleks olla ettevaatlik, et vältida plahvatusohtliku kontsentratsiooni tekkimist.

Osakeste suurusjaotus

14. Osakeste suurusjaotus tuleks määrata kõigi aerosoolide puhul ja samuti aurude puhul, mis võivad kondenseeruda ja moodustada aerosooli. Hingamisteede kõigi asjakohaste piirkondadega kokkupuute võimaldamiseks soovitatakse kasutada aerosoole, mille osakeste massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) on vahemikus 1–4 µm ning geomeetriline standardhälve (σ_g) on 1,5–3,0 (8, 13, 14). Kõnealuse standardi järgimiseks tuleks teha mõistlikud jõupingutused; kui standardit ei ole võimalik järgida, tuleks esitada eksperdi hinnang. Näiteks metallisuitsu osakesed võivad olla kõnealusest normväärtusest väiksemad ning laenguga osakesed, kiud ja hügrokoopseid materjalid (mille suurus hingamisteede niiskes keskkonnas suureneb) võivad olla suuremad.

▼ **M4****Uuritava kemikaali preparaati kandaines**

15. Selleks et tagada uuritava kemikaali vajalik kontsentratsioon õhus ja osakeste suurus, võib olla vaja kasutada kandainet. Eelistatult tuleks kasutada vett. Aineosakesi võib töödelda mehaaniliselt, et saavutada osakeste soovitud suurusjaotus, kuid tuleks olla hoolikas, et uuritavat kemikaali mitte lagundada ega muuta. Kui mehaaniline töötlus (näiteks tugeval jahvatamisel hõõrdumisest tekkinud kõrge temperatuur) võib olla uuritava kemikaali koostist muutnud, tuleks uuritava kemikaali koostist analüüsiga kontrollida. Tuleks olla hoolikas, et vältida uuritava kemikaali saastamist. Ei ole vaja katsetada raskesti peenestuvat teralist materjali, mis on sihipäraselt valmistatud nii, et seda ei saaks sisse hingata. Materjali hõõrdumisega tuleks tõendada, et teralise materjali käsitlemisel ei teki sissehingataavaid osakesi. Kui hõõrumiskatsel tekib sissehingataavaid osakesi, tuleks teha sissehingamisel mürgisust näitav katse.

Loomade kontrollrühm

16. Samaaegne negatiivne (puhtas õhus peetavate) loomade kontrollrühm ei ole vajalik. Kui katsekeskkonna loomiseks kasutatakse muud kandainet kui vesi, tuleks kandaine kontrollrühma kasutada ainult juhul, kui varasemad sissehingamisel avalduva mürgisuse andmed ei ole kättesaadavad. Kui kandaines sisalduva uuritava kemikaali mürgisuse uuringus mürgisust ei leita, siis võib järeldada, et kandaine ei ole katsetatud kontsentratsioonil mürgine, seega ei ole kandaine kontrollrühm vajalik.

KOKKUPUUTETINGIMUSTE SEIRE**Kambri õhuvarustus**

17. Igas kokkupuutekatses tuleks kambri õhuvarustust hoolikalt kontrollida, pidevalt seirata ning andmed vähemalt kord tunnis registreerida. Keskkonnas oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (või selle stabiilsuse) seire on kõigi dünaamiliste parameetrite mõõtmisel tingimata vajalik ja kujutab endast kaudset vahendit keskkonna tekitamise kõigi asjakohaste dünaamiliste parameetrite kontrollimiseks. Eraldi tuleks jälgida, et ainult nina kaudu kokkupuute uurimise kambri ei hingataks väljahingatud õhku uuesti sisse, kuna kokkupuutestüsteemi õhuvarustus ei ole piisav uuritavat kemikaali sisaldava õhu dünaamilise voo tagamiseks. On olemas meetodika, mille abil saab tõendada, et valitud katsetingimustes ei hingata väljahingatud õhku uuesti sisse (8, 15). Hapnikusisaldus peaks olema vähemalt 19 % ja süsinikdioksiidisaldus ei tohiks ületada 1 %. Kui on alust arvata, et kõnealuseid nõudeid ei ole võimalik täita, tuleks hapniku- ja süsinikdioksiidisaldust mõõta.

Kambri temperatuur ja suhteline õhuniiskus

18. Kambri temperatuur tuleks hoida 22 ± 3 °C juures. Loomade hingamistsooni suhtelist õhuniiskust tuleks nii ainult nina kui ka kogu keha kaudu kokkupuute katsetes seirata ja registreerida vähemalt kolm korda kuni neljatunnise katse jooksul ning iga tund lühema katse puhul. Suhtelist õhuniiskust tuleks eelistatult hoida vahemikus 30–70 %, kuid uuritava kemikaali mõju tõttu (näiteks veepõhise segu uurimisel) ei pruugi see olla saavutatav või mõõdetav.

▼ **M4****Uuritav kemikaal – nimikontsentratsioon**

19. Kui see on võimalik, tuleks kokkupuutekambri nimikontsentratsioon alati arvutada ja registreerida. Nimikontsentratsioon on katsekeskkonda lisatud uuritava kemikaali mass, mis on jagatud läbi kambriüsteemi suunatud õhu kogumahuga. Nimikontsentratsiooni ei kasutata loomade kokkupuute iseloomustamiseks, kuid nimikontsentratsiooni võrdlus tegeliku kontsentratsiooniga näitab katsesüsteemi kemikaali lisamise tõhusust ning seega saab seda kasutada kemikaali lisamisel esinevate probleemide avastamiseks.

Uuritav kemikaal – tegelik kontsentratsioon

20. Tegelik kontsentratsioon on proovist määratud uuritava kemikaali kontsentratsioon loomade hingamistsoonis inhalatsioonikambris. Tegelikke kontsentratsioone on võimalik saada kas spetsiifiliste meetodite abil (näiteks otsene proovivõtt, adsorptsiooni või keemilise reaktsiooni meetodid ning järgnev analüüsimine) või mittespetsiifiliste meetodite abil, näiteks filtrite gravimeetriline analüüs. Gravimeetrilise analüüsi kasutamine on lubatud ainult ühest koostisainest koosneva pulberaerosooli või vähelenduva vedeliku aerosooli korral ja see peaks olema enne katse tegemist kinnitatud konkreetse kemikaali määramisega. Mitmest koostisainest koosneva pulberaerosooli kontsentratsiooni kindlaksmääramiseks võib samuti kasutada gravimeetrilist analüüsi. Sel juhul tuleb analüüsiga tõendada, et õhus oleva materjali koostis sarnaneb lähtematerjali koostisega. Kui selline teave ei ole kättesaadav, võib osutada vajalikuks teha uuringu vältel uuritava kemikaali (eelistatult lenduvas olekus) kordusanalüüsi korrapäraste ajavahemike järel. Aerosoolainete puhul, mis võivad aurustuda või sublimeeruda, tuleks näidata, et valitud meetodiga koguti kõiki faase. Katseprotokollis tuleks esitada siht-, nimi- ja tegelikud kontsentratsioonid, kuid letaalse kontsentratsiooni arvutamiseks kasutatakse statistilises analüüsis ainult tegelikke kontsentratsioone.
21. Võimaluse korral tuleks kasutada uuritava kemikaali ühte partiid ning uuritavat proovi tuleks säilitada tingimustes, milles säilib selle puhtus, homogeensus ja stabiilsus. Enne uuringu alustamist tuleks uuritavat kemikaali, sh selle puhtust, iseloomustada; kui see on tehniliselt võimalik, tuleb keemiliselt määratleda ka kindlakstehtud saasteained ja lisandid ning määrata nende kogused. Seda on võimalik tõendada muu hulgas järgmiste andmete alusel: retentsiooniaeg ja suhteline piigipindala, molekulmass massispektroskoopia või gaaskromatograafia analüüsides või muud hinnangud. Kui uurimislabor ei vastuta uuritava kemikaali proovi keemilise määramise eest, võib uurimislaboril olla mõttekas kinnitada tellija iseloomustust vähemalt piiratud ulatuses (näiteks värv, füüsikalised omadused jne).
22. Kokkupuutekeskonda hoitakse võimaluste piires muutumatuna ja seiratakse pidevalt ja/või pisteliselt, olenevalt analüüsimeetodist. Kui kasutatakse pistelist proovivõttu, tuleks neljatunnise uuringu vältel võtta kambrikeskkonnast proove vähemalt kaks korda. Kui see ei ole piiratud õhuväru või väikeste kontsentratsioonide tõttu võimalik, võib kogu kokkupuuteperioodi kohta võtta ühe proovi. Kui proovide analüüsimisel saadakse oluliselt erinevad tulemused, tuleks järgmiste uuritavate kontsentratsioonide puhul võtta kokkupuute kohta neli proovi. Kambrist võetud proovide kontsentratsioon ei tohiks keskmisest kontsentratsioonist erineda rohkem kui $\pm 10\%$ gaaside ja aurude puhul või $\pm 20\%$ vedelik- või pulberaerosoolide korral. Tuleks arvutada kambri tasakaaluoleku saavutamise aeg (t_{95}) ja see registreerida. Kokkupuute kestus on aeg, mille vältel lisatakse uuritavat kemikaali ja seejuures arvestatakse t_{95} saavutamiseks vajalikku ajavahemikku. Juhendid t_{95} hindamise kohta on esitatud juhenddokumendis nr 39 (8).

▼M4

23. Väga keeruka segu puhul, mis koosneb gaasidest/aurudest ja aerosoolidest (näiteks põlemiskeskonnad ja uuritavad kemikaalid, mida paiskab välja mõni eriotstarbeline lõppkasutustoodet või -seade), võib iga faas käituda inhalatsioonikambris erinevalt, nii et tuleks valida vähemalt üks uuritav aine (mida analüüsiga määratakse), tavaliselt sellise segu peamine toimeaine, iga faasi (gaas/aur ja aerosool) kohta. Kui uuritav kemikaal on segu, siis tuleks kirja panna kogu segu analüütiline kontsentratsioon ja mitte ainult toimeaine või komponendi (analüüsiga määratava aine) kontsentratsioon. Lisateave tegelike kontsentratsioonide kohta on juhenddokumendis nr 39 (8).

Uuritav kemikaal – osakeste suurusjaotus

24. Aerosooliosakeste suurusjaotus tuleks kindlaks määrata vähemalt kaks korda iga neljatunnise kokkupuute ajal, kasutades kaskaadimpaktorit või alternatiivset seadet, näiteks aerodünaamilist osakeste suuruse määrajat. Kui on võimalik tõendada kaskaadimpaktori ja alternatiivse seadme abil saadud tulemuste võrdväärsust, võib kogu uuringu tegemiseks kasutada alternatiivset seadet. Paralleelselt peamise seadmega tuleks kasutada muud seadet, näiteks gravimeetrilist filtrit või minitsüklonit või gaasipesukolbi, et veeenduda peamise seadme kogumistõhususes. Osakeste suuruse analüüsi kaudu saadud massikontsentratsioon peaks mõistlikes piirides kokku langema filtrianalüüsi abil saadud massikontsentratsiooniga (vt juhenddokument nr 39 (8)). Kui uuringu varajases etapis on võimalik tõendada võrdväärsust, siis võib loobuda täiendavatest kinnitavatest mõõtmistest. Loomade heaolu silmas pidades tuleks võtta meetmeid, et mitte saada katsest ebaselgeid andmeid, mille tõttu võib olla vajalik kokkupuudet korrata. Aurudega tuleks teha osakeste suurusjaotuse määramine sel juhul, kui on võimalik, et auru kondensatsiooni tõttu võib tekkida aerosool, või kui auru keskkonnas tuvastatakse osakesi, mille puhul võib tegemist olla faaside seguga (vt punkt 14).

KATSE KÄIK**Põhikatse**

25. Igal etapil kasutatakse kolme looma kummagi soo kohta või kuut looma sellest soost, mis on tundlikum. Kui ainult nina kaudu toimuvat kokkupuudet kasutatakse muu näriliseliigi kui roti korral, võib suurimat kokkupuute kestust kohandada, et minimeerida konkreetse kasutatava liigi isendite kannatusi. Lähtedoošina kasutatavaks kontsentratsiooniks valitakse üks nelja kindlaksmääratud taseme hulgast ning lähtekontsentratsioon peaks olema selline, mis tekitab kõige tõenäolisemalt mürgistuse mõnele loomale, kellele doos manustatakse. Gaaside, aurude ja aerosoolide katsete skeemid (mis on lisatud 2.–4. liites) seisnevad katsetamises CLP-määruse (EÜ) nr 1272/2008) 1.–4. kategooria piirväärtustega (9) gaaside puhul (100, 500, 2 500, 20 000 ppm nelja tunni jooksul) (2. liide), aurude puhul (0,5, 2, 10, 20 mg / l nelja tunni jooksul) (3. liide) ja aerosoolide puhul (0,05, 0,5, 1,5 mg / l nelja tunni jooksul) (4. liide). 5. kategooria, mida ei ole määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) rakendatud, on seotud vastavaid piirkontsentratsioonide ületavate kontsentratsioonidega. Iga lähtekontsentratsiooni puhul kohaldatakse vastavat katsetamise skeemi. Humaanselt surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseprotseduuris vastavalt nooltega näidatud suunale, kuni on võimalik määrata kategooria.
26. Ajavahemik katserühmade kokkupuutekatsete vahel määratakse kindlaks mürgistusnähtude alguse, kestuse ja raskuse järgi. Loomade kokkupuude järgmise kontsentratsiooniga tuleks edasi lükata seni, kuni eelmises katsetes kasutatud loomade ellujäämises võib olla mõistlikkuse piires veendunud. Enne iga järgmise kontsentratsiooniga kokkupuudet soovitatakse oodata kolm või neli päeva, et oleks võimalik jälgida hiljem avalduvat mürgistust. Ajavahemikku võib vajaduse korral korrigeerida, nt ebaselge vastuse puhul.

▼ **M4****Piirsalduskatse**

27. Piirsalduskatset kasutatakse, kui uuritav kemikaal ei ole teadaolevalt või eeldatavalt mürgine, s.o mürgistus tekib ainult regulatiivse piirkontsentratsiooni ületamise puhul. Teavet uuritava kemikaali mürgisuse kohta võib saada varem katsetatud samalaadseid aineid või samalaadseid segusid käsitlevatest andmetest, võttes arvesse toksikoloogiliselt oluliste koostisainete keemilist laadi ja sisaldust. Kui teavet mürgisuse kohta on vähe või ei ole üldse või kui uuritav kemikaal on eeldatavasti mürgine, tuleks sooritada põhikatse (täpsemad suunised on esitatud juhenddokumendis nr 39 (8)).
28. Tavalise meetodi kasutamisel viiakse kolm looma kummagi soo kohta või kuus looma sellest soost, kumb on tundlikum, kokkupuutesse vastavalt kontsentratsiooniga 20 000 ppm gaaside puhul, 20 mg/l aurude korral ja 5 mg/l tolmu/udu puhul (kui see on saavutatav), mis on käesoleva katsemetodi piirsalduskatse. Aerosooli katsetamisel peaks olema peamine eesmärk saavutada sissehingamiseks sobiv osakese suurus (st osakeste massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) on 1–4 µm). See on enamiku uuritavate kemikaalide puhul võimalik kontsentratsioonil 2 mg/l. Aerosooli katsetamist rohkem kui 2 mg/l juures tuleks proovida ainult juhul, kui sissehingamiseks sobiv osakeste suurus on võimalik saavutada (vt juhenddokument nr 39 (8)). Ühtse ülemaailmse kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteemi (GHS) (16) kohaselt ei ole katsetamine suuremal kui piirkontsentratsioonil loomade heaolu kaalutlustel soovitatav. GHSi 5. kategooria (16) kohast katsetamist, mida ei ole määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) rakendatud, tuleks kaaluda ainult juhul, kui on suur tõenäosus, et kõnealuse katse tulemused on otseselt seotud inimeste tervise kaitsega, ning seda tuleks sel juhul uuringuprotokollis põhjendada. Plahvatusohtliku uuritava kemikaali puhul tuleks olla hoolikas, et vältida plahvatust võimaldavaid tingimusi. Loomade tarbetu kasutamise vältimiseks tuleks enne piirsalduskatset teha proovikatse ilma loomadeta, et tagada piirsalduskatse jaoks vajalike kambritingimuste saavutamine.

VAATLUSED

29. Loomi tuleks kokkupuute ajal sageli kliiniliselt jälgida. Pärast kokkupuudet tuleks kliinilised vaatlused korraldada vähemalt kaks korda kokkupuutepäeva jooksul või, kui loomade reageerimine kokkupuutele seda nõuab, ka sagedamini, ja seejärel vähemalt kord päevas kokku 14 päeva jooksul. Vaatlemise ajavahemiku kestus ei ole kindlaks määratud; see tuleks määrata kliiniliste nähtude laadi, tekkimisaja ja taastumisperioodi pikkuse alusel. Mürgistusnähtude ilmumise ja kadumise aeg on oluline eelkõige juhul, kui mürgistusnähtudel on kalduvus avalduda viitmõjuna. Kõik vaatlused registreeritakse süstemaatiliselt, säilitades iga looma kohta eraldi andmed. Suremas olevad loomad ja loomad, kellel esinevad tugeva valu ja/või püsivad suurte kannatuste tunnused, tuleks loomade heaolu kaalutlustel humaansel viisil surmata. Uuringute tegemisel tuleks olla hoolikas, et mürgistuse kliinilisi tunnuseid kindlaks tehes vältida kokkupuutest põhjustatud esialgse halva välimuse ja hingamise ajutiste muutuste pidamist töötlemisega seotud mõjudeks. Arvesse tuleks võtta humaansete lõpetamiskriteeriumide juhisdokumendis esitatud põhimõtteid ja kriteeriume (7). Kui loomad surmatakse humaansel kaalutlustel või leitakse surnuna, tuleks surmaaeg võimalikult täpselt registreerida.

▼M4

30. Puuri juures tehtavad vaatlused peaksid hõlmama naha ja karvkatte, silmade ja limaskestade, hingamise, vereringe- ning autonoomse ja tsentraalse närvisüsteemi muutusi, somatomotoorset aktiivsust ja käitumismustrit. Võimaluse korral tuleks eristada lokaalset ja süsteemset mõju ja need registreerida. Tuleb pöörata tähelepanu värinate, krampide, süljevooluse, kõhulahtisuse, letargia, une ja kooma esinemisele. Pärakutemperatuuri mõõtmine võib anda lisaandmeid refleksipõhise hingamise aeglustumise või hüpo-/hüpertermia kohta, mis on seotud kokkupuute või vangistusega.

Kehamassid

31. Iga looma kehamass tuleks registreerida üks kord kohanemise perioodi vältel, kokkupuute päeval enne kokkupuudet (päev 0) ning vähemalt päevadel 1, 3 ja 7 (ning seejärel iga nädal) ja surma või eutanaasia korral, kui see toimub pärast päeva 1. Kehamass on teatavasti mürgistuse oluline näitaja ja seega tuleks täpselt jälgida loomi, kelle kehamass väheneb püsivalt > 20 % võrreldes uuringueelsete näitajatega. Ellujäänud loomad kaalutakse ja surmatakse humaansel viisil kokkupuutejärgsel ajavahemikul.

Patoloogia

32. Kõik katseloomad (kaasa arvatud need, kes surid katse käigus või kes surmati eutanaasiaga või kõrvaldatakse uuringust loomade heaolu tagamiseks) lahatakse täielikult. Kui lahkamine vahetult pärast surnud looma leidmist ei ole võimalik, tuleks loom jahutada (mitte külmutada) autolüüsi minimeerimiseks piisavalt madala temperatuurini. Lahata tuleks võimalikult kiiresti, tavaliselt ühe või kahe päeva jooksul. Iga looma kõik üldpatoloogilised muutused tuleks registreerida, pöörates eritähelepanu hingamisteede mis tahes muutustele.
33. Uuringu tõlgendusväärtuse laiendamiseks võib kaaluda uuringu kavasse eelnevalt ettenähtud täiendavate uuringute lisamist, nagu ellujäänud rottide kopsude kaalu mõõtmine ja/või hingamisteede ärrituse tõendamine hingamisteede mikroskoobiga vaatlemise teel. Uurida võib ka organeid, milles 24 tundi või kauem elanud loomadel esineb patoloogilisi muutusi, samuti organeid, mis teadaolevalt või eeldatavasti võivad olla kahjustatud. Kogu hingamistee mikroskoobiuuring võib anda kasulikku teavet veega reageeriva uuritava kemikaali, näiteks happe või hügrokoopse kemikaali kohta.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmed**

34. Tuleks esitada andmed iga üksiku looma kehamassi ja lahkamistulemuste kohta. Kliiniliste vaatluste andmed tuleks esitada kokkuvõtlikult tabeli kujul, näidates iga katserrühma puhul ära osalenud loomade arvu, konkreetsete mürgistusnähtudega loomade arvu, katse käigus surnuna leitud või humaansetel põhjustel surmatud loomade arvu, iga looma surmaaja, toksiliste mõjude ja nende ajalise kulu kirjelduse ja pöördumise ning lahanguleiud.

▼ **M4****Katseprotokoll**

35. Katseprotokoll peaks sisaldama võimaluse korral järgmist teavet.

Katseloomad ja pidamistingimused

- Puuritingimuste kirjeldus, sh: loomade arv (või arvu muutus) puuri kohta, allapanu, õhu temperatuur ja suhteline niiskus, valgustusperiood ja sööt.
- Kasutatud liik/liin ja muu liigi kui roti kasutamise põhjendus.
- Loomade arv, vanus ja sugu.
- Randomiseerimismeetod.
- Üksikandmed sööda ja vee kvaliteedi kohta (sh sööda tüüp/allikas, vee allikas).
- Kõigi eelnenud ettevalmistamismeetmete kirjeldus, sh söötmine, karantiin ja haiguste ravi.

Uuritav kemikaal

- Füüsikaline olek, puhtus ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused (kaasa arvatud isomeerne koostis).
- Identifitseerimisandmed, Chemical Abstract Services Registry ehk CASi nr, kui see on teada.

Kandeaaine

- Kandeaaine kasutamise põhjendus ja valiku põhjendus (kui kandeaainena ei kasutata vett).
- Varasemad või rööpandmed, millega tõendatakse, et kandeaaine ei mõjuta uuringu tulemusi.

Inhalatsioonikamber

- Inhalatsioonikambri kirjeldus, sh selle mõõtmed ja maht.
- Loomade kokkupuute jaoks kasutatavate seadmete päritolu ja kirjeldus ning samuti keskkonna tekitamise kirjeldus.
- Temperatuuri, niiskuse, osakeste suuruse ja tegeliku kontsentratsiooni mõõtmise seadmed.
- Õhuallikas ja kambrisse suunatud / kambrist välja lastud õhu töötlemiseks ning konditsioneerimiseks kasutatav süsteem.
- Homogeense katsekeskkonna tagamise seadmete kalibreerimisel kasutatud meetodid.
- Rõhuerinevus (positiivne või negatiivne).
- Kokkupuuteportide arv kambri kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude); loomade paiknemine süsteemis (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).
- Katsekeskkonna ajaline homogeensus/stabiilsus.
- Temperatuuri- ja niiskusandurite paigutus ning katsekeskkonna proovide võtmine kambris.
- Õhuvoolu kiirused, õhuvoolu kiirus kokkupuutepordi kohta (ainult nina kaudu toimuv kokkupuude) või loomade hulk kambri kohta (kogu keha kaudu toimuv kokkupuude).
- Teave hapniku ja süsinikdioksiidi sisalduse mõõtmiseks kasutatud seadmete kohta, vajaduse korral.

▼ M4

- Inhalatsioonikambri tasakaaluseisundini jõudmiseks vajalik aeg (t_{95}).
- Kogu kambri oleva õhu vahetuste arv tunnis.
- Mõõteseadmed (vajaduse korral).

Andmed kokkupuute kohta

- Põhiuuringu sihtkontsentratsiooni valimise põhjendus.
- Nimikontsentratsioonid (inhalatsioonikambri suunatud uuritava kemikaali kogumass, mis on jagatud läbi kambri juhitud õhu kogusega).
- Uuritava kemikaali tegelikud kontsentratsioonid loomade hingamistsoonist kogutud proovides; heterogeensel füüsilisel kujul esineva segu (gaas, aur, aerosool) puhul võidakse analüüsida iga faasi eraldi.
- Kõik õhukontsentratsioonid tuleks teatada massiühikutes (mg/l, mg/m³ jne), kontsentratsioonid mahuühikutes (ppm, ppb jne) võib teatada sulgudes.
- Osakeste suurusjaotus, massikeskmine aerodünaamiline diameeter (MMAD) ja geomeetiline standardhälve (σ_g) ning nende arvutusmeetodid. Tuleks teatada üksikosakeste suuruse analüüsid.

Katsetingimused

- Üksikasjalikud andmed uuritava kemikaali ettevalmistamise kohta, sh andmed mis tahes meetmete kohta, mida kasutati tahke aine osakeste suuruse vähendamiseks või uuritava kemikaali lahuste valmistamiseks. Kui mehaanilised protsessid võivad olla muutnud uuritava kemikaali koostist, tuleb lisada nende analüüside tulemused, mille abil kontrolliti uuritava kemikaali koostist.
- Katsekeskkonna tekitamiseks ja loomade kokkupuuteks katsekeskkonnaga kasutatud seadmete kirjeldus (eelistatult koos joonisega).
- Kasutatud keemilise analüüsi meetodi ja selle valideerimise üksikasjad (sh uuritava kemikaali analüütiline saagis proovivõtukeskkonna analüüsimisel).
- Katsekontsentratsioonide valiku põhjendus.

Tulemused

- Tabelitena andmed katsekambri temperatuuri, niiskuse ja õhuvoolu kohta.
- Tabelitena andmed kambri nimi- ja tegeliku kontsentratsiooni kohta.
- Tabelid osakeste suurusjaotuse andmete kohta, sh analüüsiproovide võtmise andmed, osakeste suurusjaotus ning MMAD ja σ_g arvutamine.
- Tabelid iga looma reageerimise andmete (st mürgistustunnustega loomad, kaasa arvatud suremus, mõjude laad, raskus ja kestus) ja annusemäärade kohta.
- Uuringupäeval registreeritud iga looma kehamass; surmakuupäev ja -aeg, kui loom sureb enne plaanijärgset eutanaasiat, mürgistusnähtude tekke aeg ja pöördumus iga looma puhul.

▼ **M4**

- Iga looma lahanguleiud ja histopatoloogilised leiud, kui need on olemas.
- CLP-määruse kohane kategooria klassifikatsioon ja LC₅₀ piirväärtus.

Tulemuste arutelu ja tõlgendamine

- Eritähelepanu tuleks pöörata nende meetodite kirjeldamisele, mida kasutati käesoleva katsemeetodi kriteeriumide täitmiseks, näiteks piirkontsentratsioon või osakeste suurus.
- Üldtulemuste alusel tuleks käsitleda küsimust, kas osakeste suurus oli sobiv sissehingamiseks, eelkõige siis, kui osakeste suuruse kriteeriume ei olnud võimalik täita.
- Uuringu üldhinnangus tuleks käsitleda nimi- ja tegelike kontsentratsioonide kindlaksmääramiseks kasutatud meetodite kooskõllalisust ning tegeliku ja nimikontsentratsiooni vahelist seost.
- Tuleks käsitleda tõenäolist surma põhjust ja uuritava kemikaali peamist toimeviisi (süsteemne või lokaalne).
- Kui OECD humaansete lõpetamiskriteeriumide juhenddokumendis (7) sätestatud kriteeriumide alusel tekkis vajadus humaansel viisil surmata valu kannatavaid või tõsiste ja püsivate kannatuste tunnustega loomi, siis tuleks esitada selgitus.

KIRJANDUS

- 1) Käesoleva lisa peatükk B.2 „Äge mürgisus (sissehingamisel)”.
- 2) Holzhütter H-G, Genschow E, Diener W, and Schlede E (2003). Dermal and Inhalation Acute Toxicity Class Methods: Test Procedures and Biometric Evaluations for the Globally Harmonized Classification System. *Arch. Toxicol.* 77: 243–254.
- 3) Diener W, Kayser D and Schlede E (1997). The Inhalation Acute-Toxic-Class Method; Test Procedures and Biometric Evaluations. *Arch. Toxicol.* 71: 537–549.
- 4) Diener W and Schlede E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 1: 129–134.
- 5) Käesoleva lisa peatükk B.1b „Äge suukaudne mürgisus – ägeda mürgisuse klassi määramise meetod”.
- 6) OECD (2009). Report on Biostatistical Performance Assessment of the Draft TG 436 Acute Toxic Class Testing Method for Acute Inhalation Toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 105, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 7) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 8) OECD (2009). Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 39, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 9) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1272/2008, 16. detsember 2008, mis käsitleb ainete ja segude klassifitseerimist, märgistamist ja pakendamist ning millega muudetakse direktiive 67/548/EMÜ ja 1999/45/EÜ ja tunnistatakse need kehtetuks ning muudetakse määrust (EÜ) nr 1907/2006 (ELT L 353, 31.12.2008, lk 1).

▼ M4

- 10) Käesoleva lisa peatükk B.40 „Nahasöövituskatse *in vitro*: transkutaanse elektritakistuse (TER) mõõtmine”.
- 11) Käesoleva lisa peatükk B.40a „Nahasöövituskatse *in vitro*: katse inimnaha mudeliga”.
- 12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Available at: [<http://www.oecd.org/env/testguidelines>]
- 13) Phalen RF (2009). Inhalation Studies: Foundations and Techniques. (2nd Edition) Informa Healthcare, New York.
- 14) SOT (1992). Technical Committee of the Inhalation Specialty Section, Society of Toxicology (SOT). Recommendations for the Conduct of Acute Inhalation Limit Tests. *Fund. Appl. Toxicol.* 18: 321–327.
- 15) Pauluhn J and Thiel A (2007). A Simple Approach to Validation of Directed-Flow Nose-Only Inhalation Chambers. *J. Appl. Toxicol.* 27: 160–167.
- 16) UN (2007), United Nations Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), ST/SG/AC.10/30, UN New York and Geneva. Available: [http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html]

▼ **M4**

1. liide

MÕISTE

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M4*2. liide***Toimimine gaasi iga lähtekontsentratsiooni juures (ppm nelja tunni kohta)**Üldised märkused ⁽¹⁾

Selles liites esitatud vastavad katseskeemid selgitavad, kuidas tuleb toimida iga lähtekontsentratsiooni juures.

2.a liide: lähtekontsentratsioon on 100 ppm.

2.b liide: lähtekontsentratsioon on 500 ppm.

2.c liide: lähtekontsentratsioon on 2 500 ppm.

2.d liide: lähtekontsentratsioon on 20 000 ppm.

Humaansel viisil surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseskeemis vastavalt nooltega näidatud suunale.

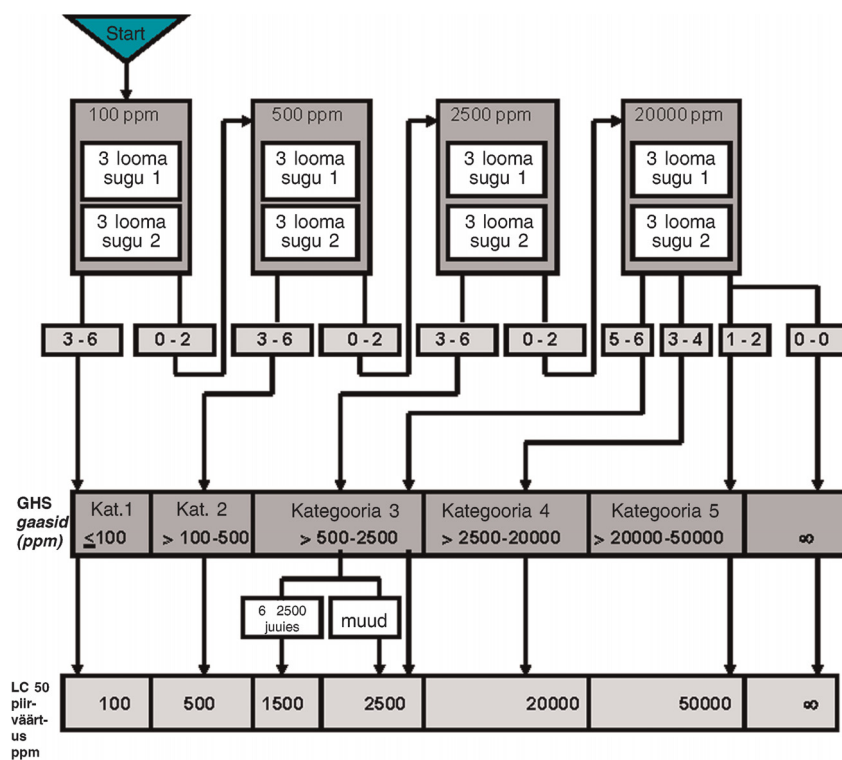
⁽¹⁾ Järgmistes tabelites viidatakse GHSile (ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem). ELi vaste on määrus (EÜ) nr 1272/2008. Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse puhul ei rakendata määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) kategooriat 5.

▼ M4

2.a liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 100 ppm 4 tunni jooksul



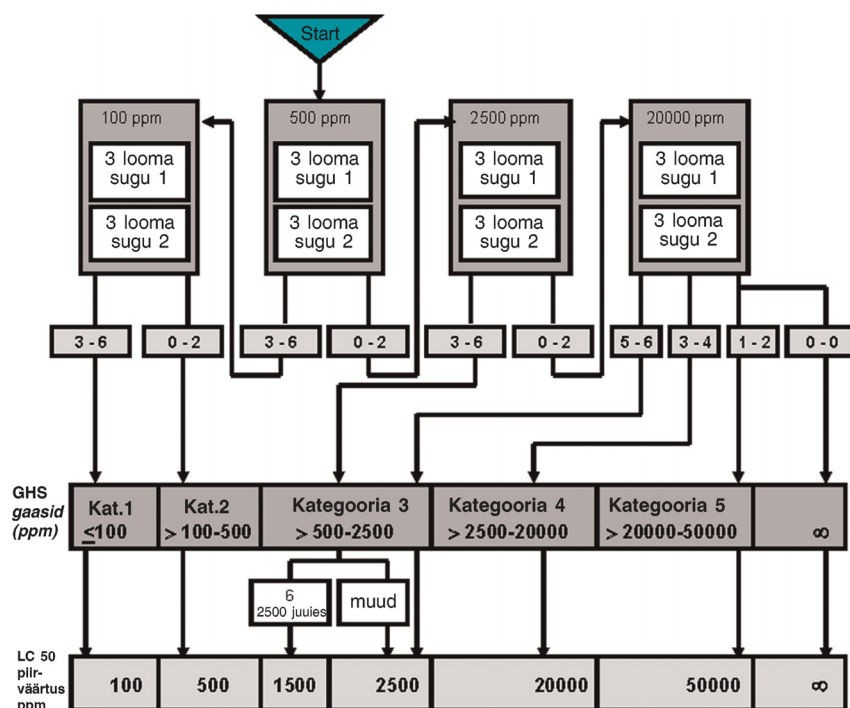
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel ≥ 20 000 ppm/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼ M4

2.b liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 500 ppm 4 tunni jooksul



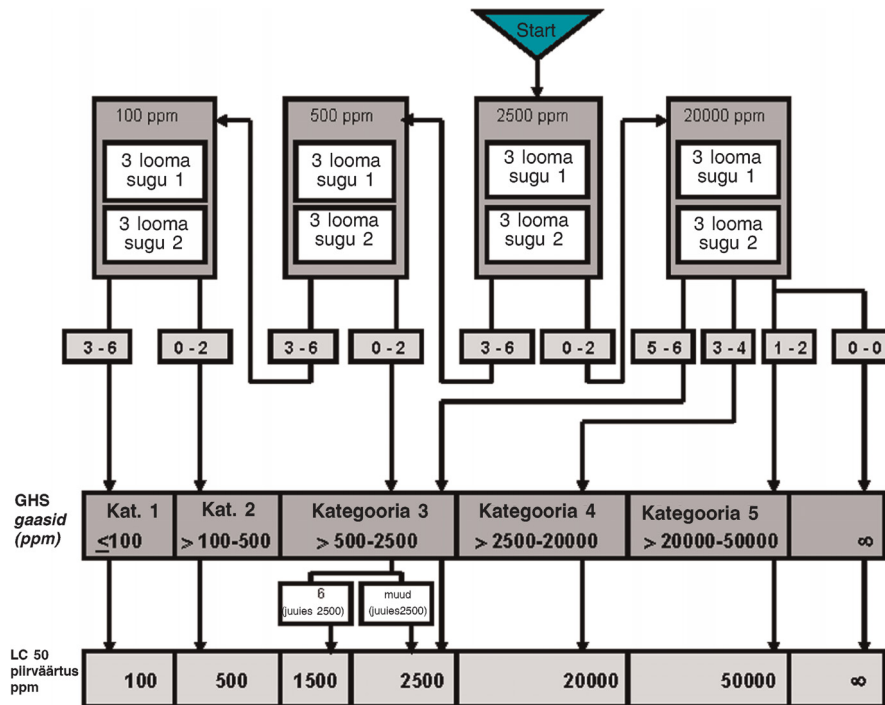
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel ≥ 20 000 ppm/4h; vt juhenddokument 39 (8).

▼M4

2.c liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 2 500 ppm 4 tunni jooksul



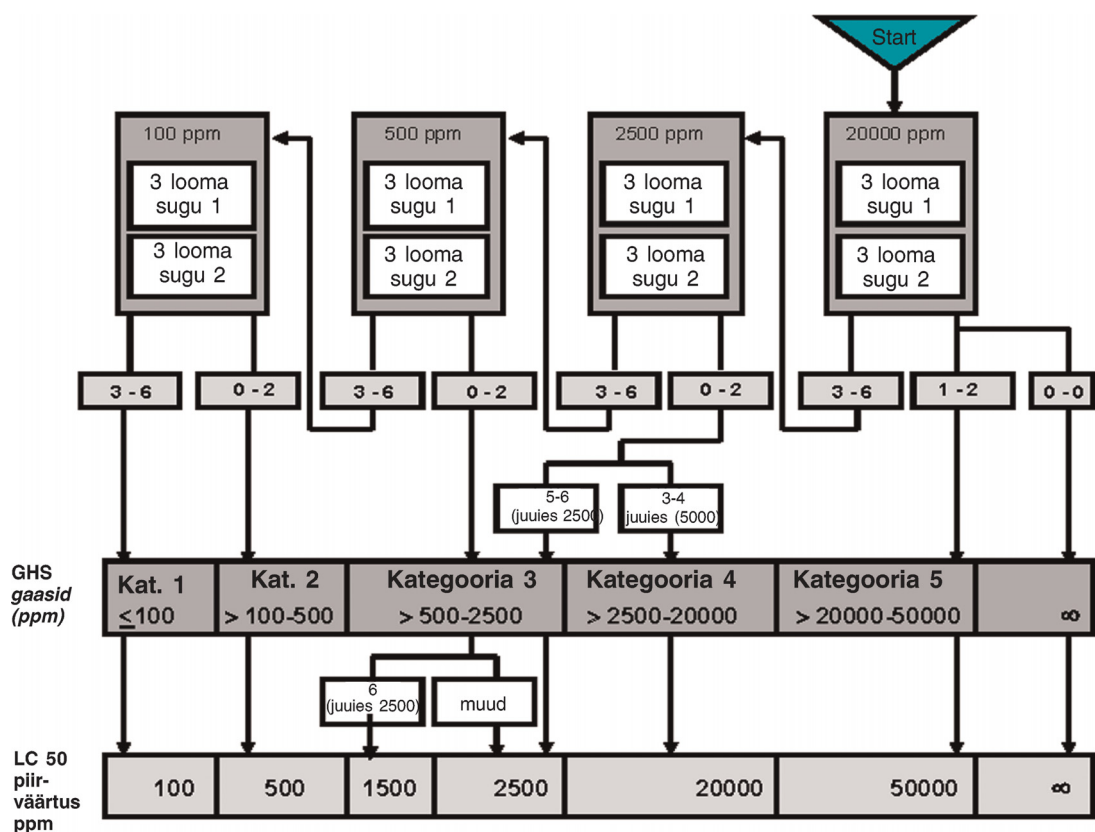
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suuremas olevate või sumud loomade arv uuritaval kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel $\geq 20\ 000$ ppm/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼M4

2.d liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 20 000 ppm 4 tunni jooksul



- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel ≥ 20 000 ppm/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼M4*3. liide***Toimimine auru iga lähtekontsentratsiooni juures (mg/l nelja tunni kohta)**Üldised märkused ⁽¹⁾

Selles liites esitatud vastavad katseskeemid selgitavad, kuidas tuleb toimida iga lähtekontsentratsiooni juures.

3.a liide: lähtekontsentratsioon on 0,5 mg/l.

3.b liide: lähtekontsentratsioon on 2,0 mg/l.

3.c liide: lähtekontsentratsioon on 10 mg/l.

3.d liide: lähtekontsentratsioon on 20 mg/l.

Humaansel viisil surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseskeemis vastavalt nooltega näidatud suunale.

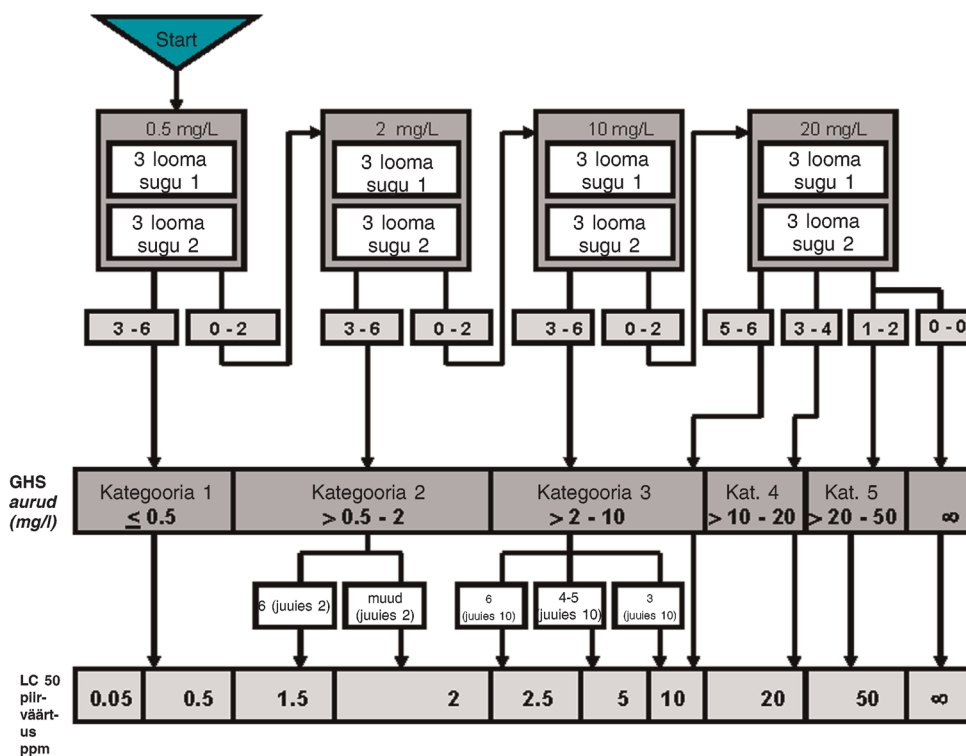
⁽¹⁾ Järgmistes tabelites viidatakse GHSile (ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem). ELi vaste on määrus (EÜ) nr 1272/2008. Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse puhul ei rakendata määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) kategooriat 5.

▼M4

3.a liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aurude puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 0,5 mg/l 4 tunni jooksul



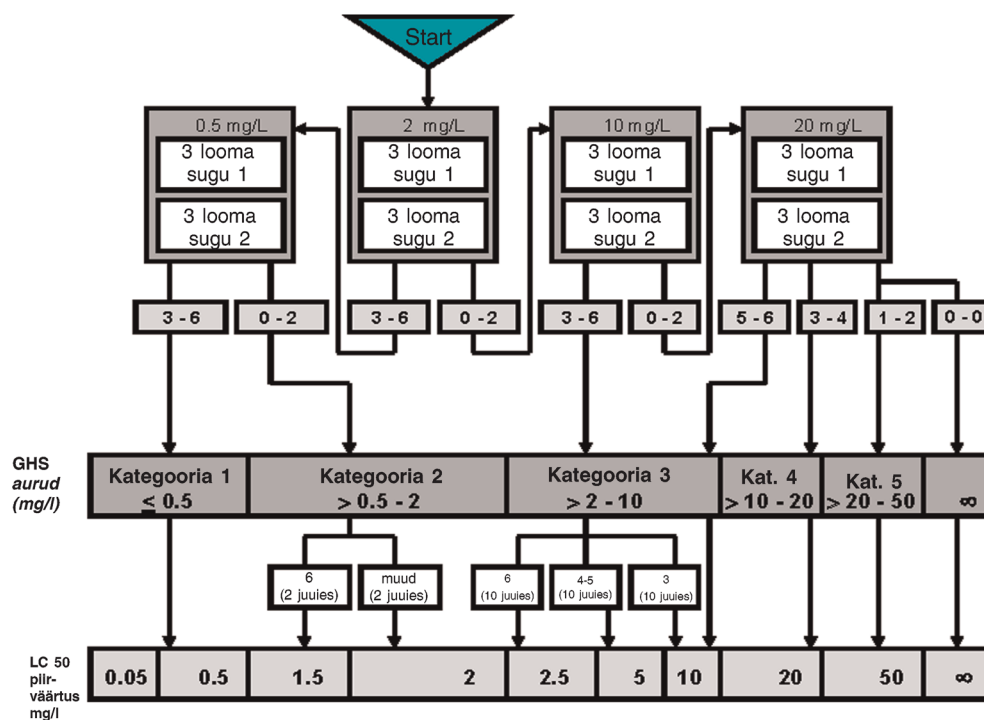
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suuremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 50 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼M4

3.b liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine gaaside puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 2 mg/l 4 tunni jooksul



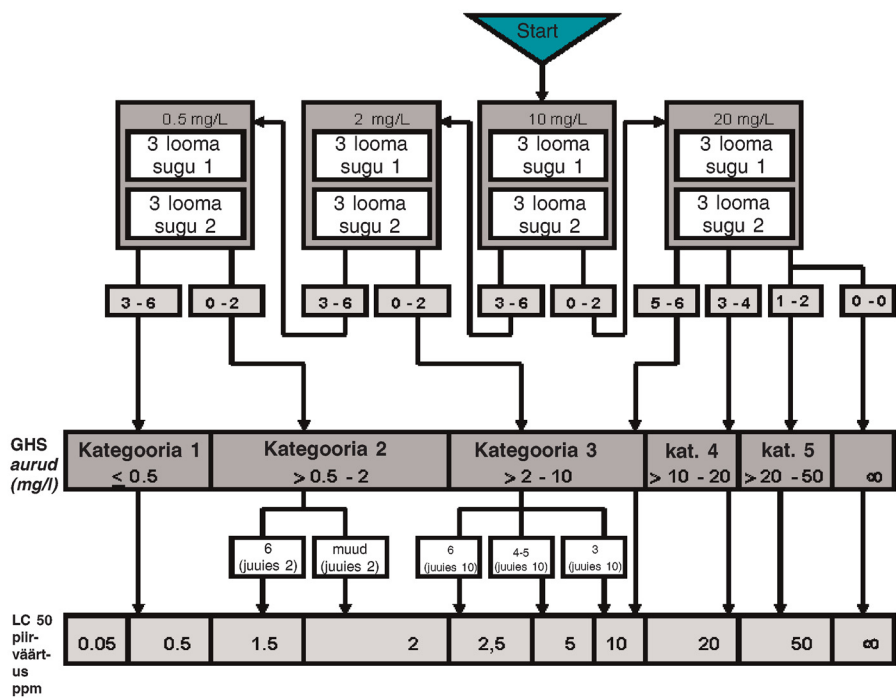
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞ : klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 50 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼ M4

3.c liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aurude puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 10 mg/l 4 tunni jooksul



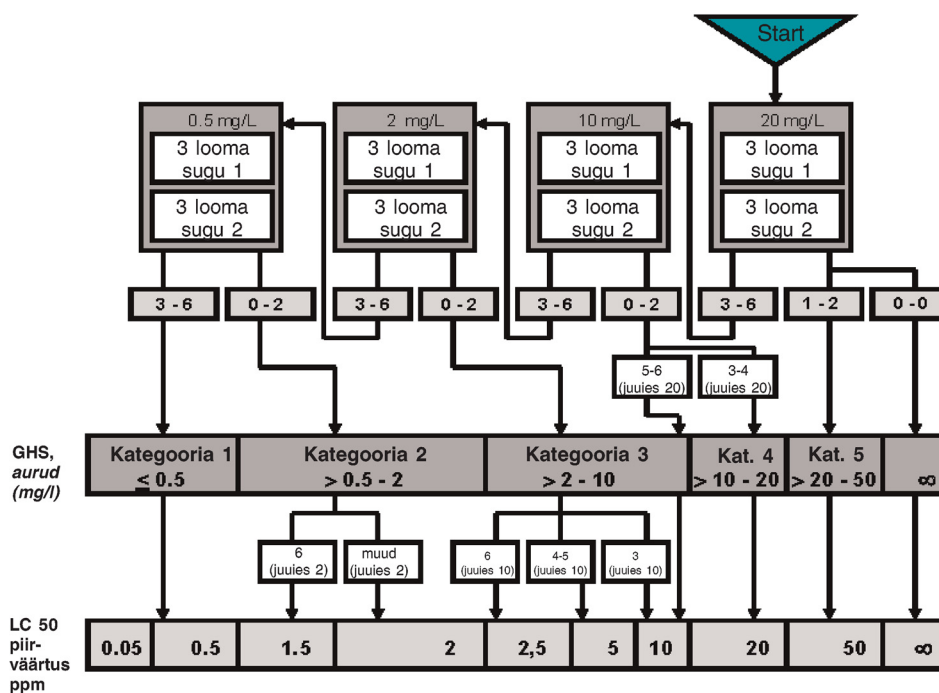
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suuremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 50 mg/l/4h; vt juhenddokument 39 (8)

▼ M4

3.d liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aurude puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 20 mg/l 4 tunni jooksul



- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suuremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞ : klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 50 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼M4*4. liide***Toimimine aerosooli iga lähtekontsentratsiooni juures (mg/l nelja tunni kohta)**Üldised märkused ⁽¹⁾

Selles liites esitatud vastavad katseskeemid selgitavad, kuidas tuleb toimida iga lähtekontsentratsiooni juures.

4.a liide: lähtekontsentratsioon on 0,05 mg/l.

4.b liide: lähtekontsentratsioon on 0,5 mg/l.

4.c liide: lähtekontsentratsioon on 1 mg/l.

4.d liide: lähtekontsentratsioon on 5 mg/l.

Humaansel viisil surmatud või surnud loomade arvust sõltuvalt toimitakse katseskeemis vastavalt nooltega näidatud suunale.

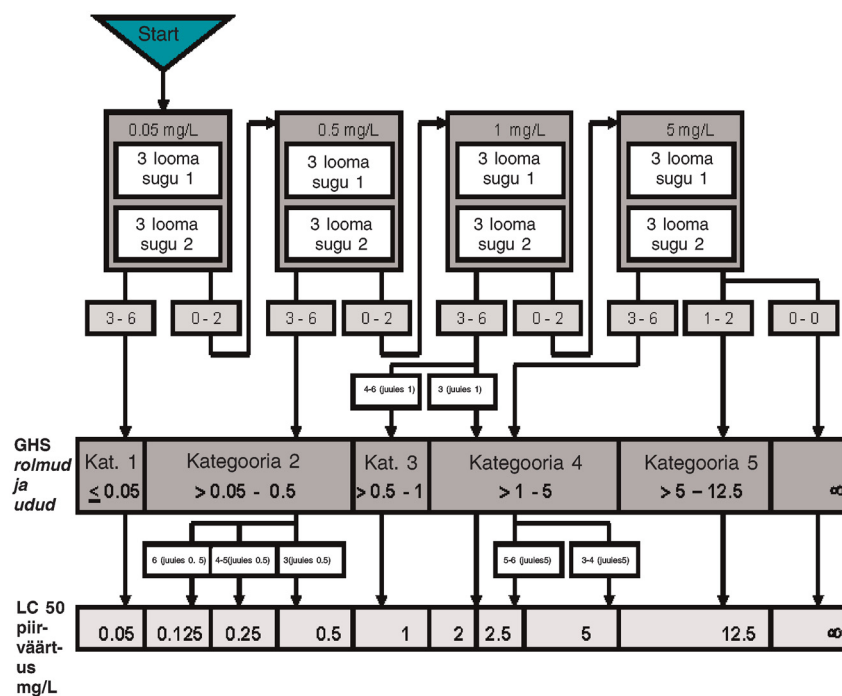
⁽¹⁾ Järgmistes tabelites viidatakse GHSile (ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise ja märgistamise süsteem). ELi vaste on määrus (EÜ) nr 1272/2008. Sissehingamisel avalduva ägeda mürgisuse puhul ei rakendata määruses (EÜ) nr 1272/2008 (9) kategooriat 5.

▼M4

4.a liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aurude puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 0,05 mg/l 4 tunni jooksul



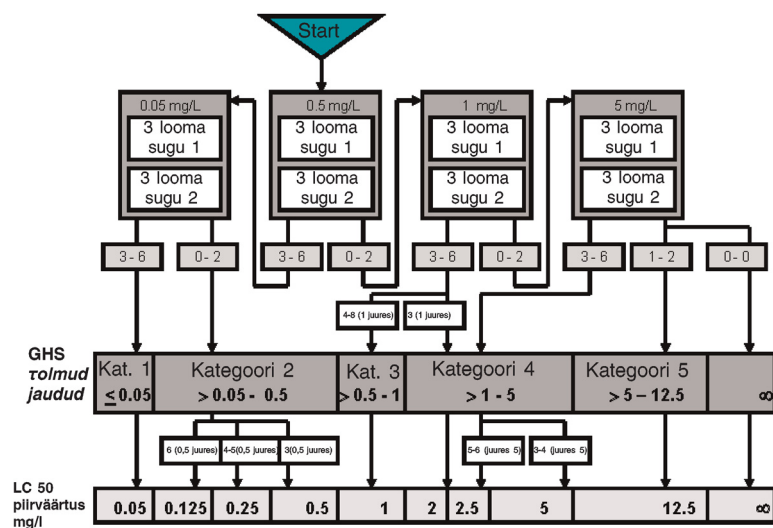
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundiikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 12,5 mg/l/4h: vt juhenddokument 39 (8)

▼M4

4.b liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aerosoolide puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 0,5 mg/l 4 tunni jooksul



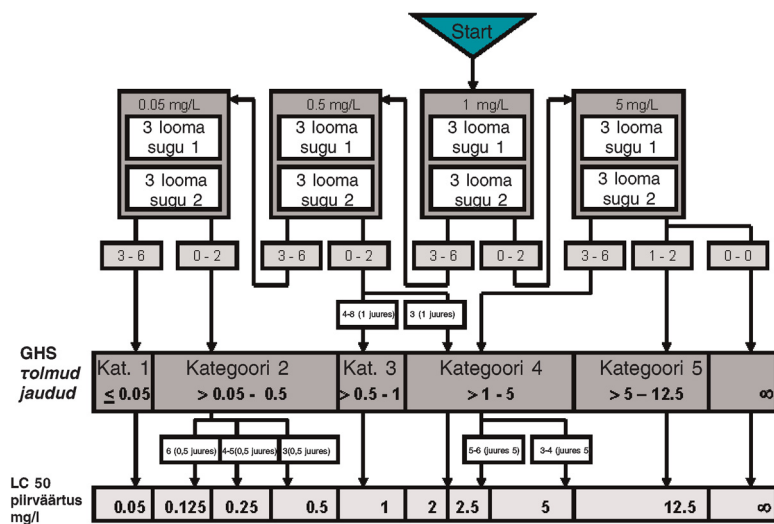
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 12,5 mg/l/4 h: vt juhenddokument 39 (8).

▼M4

4.c liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aerosoolide puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 1 mg/l 4 tunni jooksul



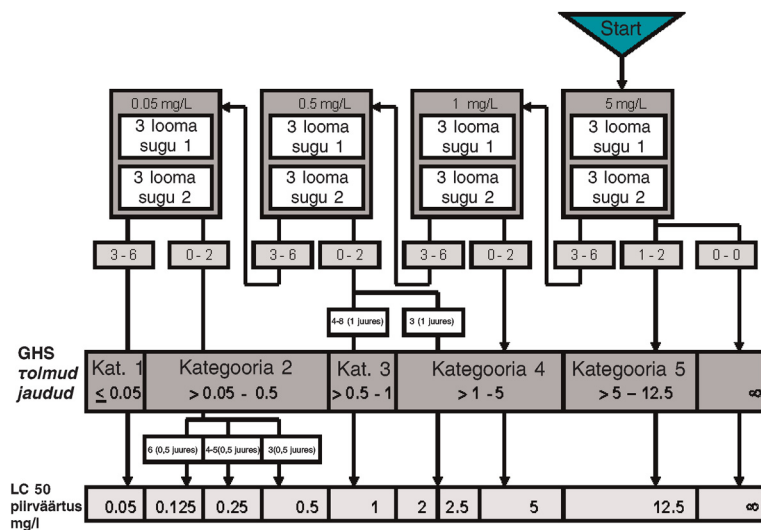
- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 12,5 mg/l/4 h: vt juhenddokument 39 (8).

▼M4

4.d liide

Äge mürgisus sissehingamisel

Toimimine aerosoolide puhul, alustades lähtekontsentratsioonist 5 mg/l
4tunni jooksul



- 3 ♂ + 3 ♀ või 6 tundlikumast soost looma kasutatakse igal etapil.
- 0-6: suremas olevate või sumud loomade arv uuritava kontsentratsioonil.
- GHS: ühtne ülemaailmne kemikaalide klassifitseerimise süsteem.
- ∞: klassifitseerimata.
- Katsed sisaldusel 12,5 mg/l/4 h: vt juhenddokument 39 (8)."

▼ M5

B.53. ARENGUHÄIREID PÕHJUSTAVA NEUROTOKSILISUSE UURING

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 426 (2007). OECD paljunemisvõimet kahjustava ja arengut mõjutava toksilisuse tööühma koosolekul Kopenhaagenis 1995. aasta juunis arutati, kas on vaja ajakohastada olemasolevaid OECD katsejuhendeid paljunemisvõimet kahjustava ja arengut mõjutava toksilisuse määramiseks ja töötada välja uusi katsejuhendeid seni veel hõlmamata näitajate määramiseks (1). Tööühm soovitas koostada katsejuhendi arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse määramiseks, võttes aluseks USA keskkonnakaitseameti (EPA) katsejuhendi, mis on hiljem läbi vaadatud (2). 1996. aasta juunis toimus Kopenhaagenis teine arutelu selleks, et koostada sekretariaadile suunised uue, arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse katse juhendi peamiste küsimuste kohta, sealhulgas näiteks loomaliigi valimise, doseerimisperioodi, hinnatavate näitajate ja tulemuste hindamise kriteeriumide kohta. Ameerika Ühendriikide suunised neurotoksilisuse riski hindamiseks avaldati 1998. aastal (3). Oktoobris 2000 toimusid üksteise järel OECD ekspertide koosolek ja ILSI (International Life Science Institute) riskihindamise seminar ning Tokyos peeti 2005. aastal ekspertide koosolek. Koosolekutel arutati seoses käesoleva katsemeetodi väljatöötamisega seniste katsejuhenditega seotud teaduslikke ja tehnilisi küsimusi ning koosolekute soovitusi (4, 5, 6, 7). Lisateavet käesoleva katsemeetodi kasutamise, tulemuste tõlgendamise ja kasutatud terminite kohta võib leida OECD juhenddokumendist nr 43 „Reproduktiivtoksilisuse määramine ja hindamine” (8) ning nr 20 „Neurotoksilisuse määramine” (9).

LÄHTEKAALUTLUSED

2. Paljud kemikaalid avaldavad inimesele ja muudele liikidele arenguhäireid põhjustavat neurotoksilist mõju (10, 11, 12, 13). Kemikaali toksiliste omaduste hindamisel võib olla vaja määrata arenguhäireid põhjustava neurotoksilise mõju võimalikkust. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringu eesmärk on koguda andmeid mõju kohta, mida emakasisene või sünnijärgne kokkupuude kemikaaliga avaldab järglaste arenevale närvisüsteemile; andmeid kogutakse doosi ja toime vahelise sõltuvuse, võimalike funktsionaalsete ja morfoloogiliste mõjude kohta.
3. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringu võib teha eraldi või reproduktiivtoksilisuse ja/või neurotoksilisuse uuringu raames (nt katsejuhendid B.34 (14), B.35 (15), B.43 (16)) või lisaks sünnieelseid arenguhäireid põhjustava toksilisuse uuringule (nt katsejuhend B.31 (17)). Kui arenguhäireid põhjustavat neurotoksilisust uuritakse muu uuringu raames, on tingimata vaja säilitada kummagi uuringutüübi terviklikkus. Kõik katsed peaksid olema kooskõlas kohaldatavate õigusaktidega või valitsuse ja institutsiooniliste suunistega katseloomade kasutamise kohta teadusuuringutes (nt 18).
4. Katselabor vaatab enne uuringu tegemist läbi ja võtab arvesse kogu olemasoleva teabe uuritava kemikaali kohta. Selline teave hõlmab järgmist: uuritava kemikaali nimetus ja struktuur, füüsikalised-keemilised omadused, muud sama kemikaaliga *in vitro* või *in vivo* tehtud mürgisuskatsete tulemused, struktuurilt sarnaste ainete toksikoloogilised andmed ning kemikaali eeldatav(ad) kasutusala(d). Selline teave on vajalik kõikide asjaosaliste veenmiseks, et katse on tähtis inimeste tervise kaitsmiseks, ja aitab valida sobivat lähtedooši.

▼ **M5****KATSE PÕHIMÕTE**

5. Katsekemikaali manustatakse loomadele tiinuse ja imetamise ajal. Katseid tehakse emasloomadega, et hinnata mõju tiinus- ja imetamisperioodil, ning katsed võivad hõlmata ka võrdleva teabe (emasloomad vs. nende järglased) hankimist. Järglased valitakse neurotoksilisuse hindamiseks pesakondadest juhuslikult. Hindamine hõlmab vaatlusi, et teha kindlaks suuri neuroloogilisi ja käitumuslikke kõrvalekaldeid; seejuures hinnatakse füüsilist arengut, käitumise ontogeneesi, motoorset aktiivsust, motoorseid ja sensoorseid funktsioone, õppimist ja mälu; samuti hinnatakse aju massi ja neuropatoloogiat sünnijärgse arengu käigus ja pärast täiskasvanuikka jõudmist.

6. Kui katsemeetodi alusel tehakse eraldi uuring, võib igas rühmas kasutada täiendavaid loomi, et teha konkreetseid neurokäitumuslikke uuringuid, neuropatoloogiat, neurokeemiat või elektrofüsioloogiat uuringuid, millega võidakse täiendada käesoleva katsemeetodi kasutamisega saadavaid andmeid (16, 19, 20, 21). Täiendavad uuringud võivad olla eriti kasulikud, kui empiirilised vaatlused, oodatav mõju või toimemehhanism viitavad mingile konkreetsele neurotoksilisuse tüübile. Nende täiendavate katsete jaoks võib kasutada emasloomi ja poegi. Lisaks võib kasutada ka *ex vivo* või *in vitro* katseid, kui need katsed ei muuda *in vivo* katsete usaldusväärsust.

KATSE ETTEVALMISTAMINE**Loomaliigi valimine**

7. Eelistatud liigiks on rott; sobivuse korral võib kasutada muid liike. Siiski tuleb silmas pidada, et lootelise ja sünnijärgse arengu kohta käesolevas katsemeetodis osutatud päevad kehtivad rottide sagedamini kasutatavate liinide puhul, ning kui kasutatakse muud loomaliiki või ebatavalist rottiliini, siis tuleb valida võrreldavad päevad. Muu liigi kasutamist tuleks põhjendada toksikoloogiliste, farmakokineetiliste ja/või muude andmete alusel. Põhjenduses tuleks viidata olemasolevatele liigispetsiifilise käitumise sünnijärgse arengu neuroloogia ja neuropatoloogia hinnangutele. Kui varasemad katsed andsid muret tekitavaid tulemusi, tuleks kaaluda sama liigi/aretusliini kasutamist. Kuna erinevate liinide rottidel on erinevad omadused, tuleks tõendada, et kasutamiseks valitud liini rotid on piisava sigivuse ja reageerimisvõimega. Kui arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringus kasutatakse muud liiki, tuleb dokumentidega tõendada selle liigi tundlikkust ja saadavate tulemuste usaldusväärsust.

Pidamis- ja söötmingimused

8. Temperatuur katseloomade ruumis peab olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peab olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Valgustustsükli võib enne paaritamist ja uuringu kestuse ajaks muuta ka vastupidiseks, et funktsionaalseid ja käitumise näitajaid saaks hinnata pimedal perioodil (punase valguse juures), kui loomad on tavaliselt aktiivsed (22). Kui valguse ja pimeduse vaheldumise tsüklit muudetakse, tuleb ette näha vajalik kohanemisperiood, et loomad kohaneksid uue tsükliga. Söötmisel võib kasutada tavapäraselt labori söödavalikut koos piiramatu hulga joogiveega. Katseprotokollis esitatakse sööda ja vee tüüp ning nii sööda kui ka vee kohta tuleks teha saasteainete analüüs.

▼ **M5**

9. Loomi võib hoida puurides eraldi või väikestes, samast soost loomade rühmadena. Paaritumine peab toimuma selleks ettenähtud puurides. Pärast toimunud paarituse tõendamist või hiljemalt tiinuse 15. päeval tuleks paariatud loomad paigutada eraldi poegimispuuridesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Paaritunud emasloomadele antakse poegimisaja lähenemisel sobivad ja kindlaksmääratud pesaehitusmaterjalid. On hästi teada, et ebasobiv kohtlemine või stress tiinuse ajal võib teha kahju, sealhulgas põhjustada loote surma enne poegimist või loote ja vastsündinud poegade arengu häireid. Selleks, et ära hoida loote surma kemikaali manustamisega mitte seotud tegurite mõjul, tuleb loomi tiinuse ajal kohelda hoolikalt ja vältida välistest teguritest, näiteks müra, tingitud stressi.

Loomade ettevalmistamine

10. Tuleks kasutada terveid loomi, kes on aklimatiseerunud laboratooriumi tingimustega ning keda ei ole varem katses kasutatud, välja arvatud juhul, kui uuring toimub muu uuringu raames (vt punkt 3). Katseloomad tuleks kirjeldada ja teatada liik, liin, päritolu, sugu, kehamass ja vanus. Igale loomale tuleb määrata ja märkida kordumatu identifitseerimisnumber. Kõikide katserühmade loomad peaksid olema võimalikult ühesuguse kaalu ja vanusega, ning need peaksid olema kasutatava liigi ja liini tavapärase vahemikus. Iga doosimäära juures tuleks kasutada noori täiskasvanud poegimata emasloomi. Õdesid ja vendi ei tohiks lasta omavahel paarituda ja tuleb hoolitseda, et seda ei juhtuks. Tiinuse 0-päevaks (tiinestumispäevaks, *gestation day*, GD) loetakse päev, millal märgati spermat tupes ja/või vaginaalkorki. Kui tarnijalt ostetakse teadaoleva tiinestumispäevaga tiined loomad, nähakse ette sobiv kohanemisaeg (nt 2–3 päeva). Paariatud emasloomad jagatakse erapooletul viisil ja võimalikult ühtlaselt kontrollrühmadesse ja katserühmadesse (nt soovitatavalt stratifitseeritud juhusliku meetodiga, et tagada rühmade vahel loomade ühtlane jaotus, näiteks kehamassi järgi). Sama isaslooma poolt viljastatud emasloomad tuleks jaotada võrdselt eri rühmade vahel.

KATSE KORRALDUS**Loomade arv ja sugu**

11. Tiinete emasloomade arv igas kontrollrühmas ja katserühmas, mille liikmed puutuvad kokku uuritava kemikaaliga, peaks olema piisav, et sünniks piisav arv järglasi neurotoksilisuse hindamiseks. Iga doosimäära puhul soovitatakse kasutada kokku 20 pesakonda. Kui iga sellise rühma kohta saavutatakse nõutav pesakondade arv, on lubatud paralleelsed ja vahelduvad rühmadega manustamiskavad; paralleelproovide arvessevõtmiseks kasutatakse sobivaid statistilisi mudeleid.
12. Hiljemalt 4. sünnijärgsel päeval (*post-natal day*, PND 4) (sünni päev on PND 0) tuleks kõikide pesakondade suurus ühtlustada; selleks surmatakse juhusliku valiku alusel liigsed pojad, et kõikide pesakondade suurus oleks võrdne (23). Pesakonna suurus ei tohiks ületada keskmist pesakonna suurust kasutatava näriliste liini puhul (8–12). Pesakonda tuleks alles jätta võrdne arv isas- ja emasloomi, kuivõrd see on võimalik. Poegade selektiivne kõrvaldamine, näiteks kehamassi põhjal, ei ole sobiv. Pärast pesakondade standardimist (liigsete poegade surmamist) ja enne edasiste funktsionaalsete näitajate määramist tuleks kõik võõrutuseelsete või võõrutusjärgsete katsete jaoks ettenähtud pesakonna liikmed varustada individuaalse kordumatu märgisega, kasutades sobivat humaanset meetodit (nt 24).

▼ M5

Loomade jagamine rühmadesse funktsionaalsete ja käitumuslike testide tegemiseks, aju massi määramiseks ja neuropatoloogiliseks hindamiseks

13. Meetodis lubatakse kasutada eri lähenemisviise selleks, et jagada loomad rühmadesse, kes puutuvad kemikaaliga kokku *in utero* ja imetamise kaudu ning kellele tehakse funktsionaalsed ja käitumuslikud testid, kellel jälgitakse suguküpsuse saabumist ja määratakse aju massi ning keda hinnatakse neuropatoloogia seisukohast (25). Vajaduse korral võib üksikjuhtudel määrata muid käitumuslike neuroloogilisi funktsioone (nt sotsiaalset käitumist), uurida neurokeemilisi või neuropatoloogilisi aspekte, kui sellega ei kahjustata algselt nõutud testide usaldusväärsust.
14. Pojad valitakse igast doosirühmast ja iga näitaja hindamiseks alates 4. sünnijärgsest päevast (PND 4). Poegade valimine rühmadesse peaks toimuma nii, et iga doosirühma iga pesakonna kummastki soost pojad oleksid võimalikult ühtlaselt esindatud kõikides testides. Motoorse aktiivsuse katsetes tuleks poegade hulgast ühtesid ja samu isas- ja emasloomapaare uurida igas võõrutuseelses vanuses (vt punkt 35). Kõikide muude käitumuslike testide tegemiseks võib määrata sama või erineva isaslooma ja emaslooma paari. Võõrutatud poegade ja täiskasvanud loomade kognitiivse talitluse hindamisel võib osutada vajalikuks määrata rühmadesse erinevad pojad, et vältida tulemuste sõltumist erineva vanuse või eelneva õppimise mõjust (26, 27). Võõrutamise ajal (PND 21) võib pojad, keda katsete tegemiseks ei valita, humaansel viisil surmata. Kõik muudatused poegade rühmadesse jagamisel tuleks katseprotokollis fikseerida. Statistiline mõõtmisühik peaks olema pesakond (või poeginud emasloom), aga mitte poeg.
15. Poegade jagamiseks rühmadesse, millega tehakse võõrutuseelseid ja -järgseid vaatlusi, kognitiivseid katseid, patoloogiavaatlusi jne, on mitmeid võimalusi (vt üldkava (joonis 1) ja rühmadesse jagamise näide (1. liide)). Soovitatav minimaalne loomade arv igas doosirühmas võõrutuseelsete ja -järgsete uuringute puhul on järgmine:

Kliinilised vaatlused ja kehamass	Kõik loomad
Üksikasjalikud kliinilised vaatlused	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Aju mass (pärast fikseerimist) PND 11–22	10/sugu (1/pesakond)
Aju mass (fikseerimata) ~ PND 70	10/sugu (1/pesakond)
Neuropatoloogia (fikseerimine immersiooni või perfusiooniga) PND 11–22	10/sugu (1/pesakond)
Neuropatoloogia (fikseerimine perfusiooniga) ~ PND 70	10/sugu (1/pesakond)
Suguküpsuse saabumine	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Muud olulised aregunäitajad (soovi korral)	Kõik loomad
Käitumise ontogenees	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Motoorne aktiivsus	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Motoorne ja sensoorne funktsioon	20/sugu (1/sugu/pesakond)
Õppimine ja mälu	10/sugu ^(a) (1/pesakond)

^(a) Kognitiivse talitluse katsed: tundlikkusest olenevalt tuleb kaaluda suurema arvu loomade kasutamist, nt kuni 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast (loomade rühmadeks jagamine, vt 1. liide) (täiendavad juhised valimi suuruse kohta on esitatud OECD juhenddokumendis 43 (8)).

▼ M5

Dooside manustamine

16. Tuleks kasutada vähemalt kolme doosimäära ja näha ette paralleelsed kontrollrühmad. Doosimäärad tuleks määrata nii, et tekkivad toksilised mõjud tugevneksid järk-järgult. Kui seda ei piira kemikaali füüsikalise-keemilised või bioloogilised omadused, tuleks kõrgeim doosimäär valida nii, et tiinel emasloomal ilmneksid mürgistusnähud (nt kliinilised sümptomid, kehamassi väiksem (mitte üle 10 %) suurenemine ja/või tõendid mürgisuse kohta sihtorganile, mis ei luba doosi piirmäära suurendada). Suurima doosi piiriks võib teatavate eranditega olla 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas. Näiteks võib inimese oodatava kokkupuute ulatus sundida kasutama suuremat doosi. Teise võimalusena tuleks teha prooviuuring või esialgsed doosivahemiku määramise katsed, et leida suurim doos, mis põhjustaks tiinel emasloomal vaid minimaalseid mürgistusnähtusid. Kui standardse arenguhäireid põhjustava toksilisuse uuringu või prooviuuringuga on näidatud, et uuritav kemikaal põhjustab arenguhäireid, peaks kõrgeim doosimäär olema selline, mis ei oleks järglaste jaoks väga mürgine, näiteks ei põhjusta järglaste surma juba emaülas või kohe pärast sündi, samuti ei põhjusta selliseid vääraarenguid, mis ei võimalda mõistlikult hinnata arenguhäireid põhjustavat neurotoksilisust. Väiksem doos tuleks valida nii, et see ei põhjustaks mingeid toksilisuse sümptomeid ei tiinel emasloomal ega järglastel, samuti mitte neurotoksilisuse sümptomeid. Doosimäärade alanev järjestus tuleks valida nii, et saaks näidata toime sõltuvust doosist ja leida täheldatavat kahjulikku toimet mitteavaldava doosi (*No-Observed-Adverse Effect Level*, NOAEL) või jälgitava toime piiri lähedase doosi, mis lubaks määrata võrdlusdoosi. Kahe- või neljakordsed vahemikud on sageli optimaalsed alanevate doosimäärade kehtestamisel ja neljanda doosirühma lisamine on sageli eelistatav väga suurte doosidevaheliste vahemike (nt üle kümne korra) puhul.
17. Doosimäärade valimisel tuleks arvesse võtta kõik olemasolevad andmed mürgisuse kohta ning ka lisateavet uuritava kemikaali või samalaadse aine metabolismi ja toksiko-kineetika kohta. Kõnealune teave aitab ehk ka näidata, et dooside manustamise režiim on valitud õigesti. Dooside otsest manustamist vastsündinud poegadele tuleks kaaluda kokkupuudet ja farmakokineetikat käsitleva teabe põhjal (28, 29). Enne dooside otseste manustamise uuringu tegemist tuleks hoolikalt kaaluda eeliseid ja puudusi (30).
18. Paralleelseks kontrollrühmaks peaks olema kahjutut ainet saav kontrollrühm või kandeainet saav kontrollrühm, kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet. Kõigile loomadele tuleks kehamassist lähtudes manustada ühesugune kogus kas uuritavat kemikaali või kandeainet. Kui dooside manustamise hõlbustamiseks kasutatakse kandeainet või muud lisaainet, tuleks pöörata tähelepanu järgmistele aspektidele: kandeaine mõju uuritava kemikaali imendumisele, jaotumisele kehas, metabolismile või peetumisele; mõju uuritava kemikaali keemilistele omadustele, mis võib muuta selle toksilisi omadusi, ning mõju loomade sööda- või veetarbimisele või toitumisele. Kandeainel ei tohiks olla mõju, mis võiks häirida uuringu tulemuste tõlgendamist; samuti ei tohiks kandeaine neurotoksilisuse tõttu põhjustada käitumishäireid, mõjutada paljunemist või embrüo arengut. Uudse kandeaine puhul tuleks lisaks kandeaine kontrollrühmale kasutada veel võltskontrollrühma. Kontrollrühma(de) loomi tuleks kohelda nii nagu katserühma loomi.

▼ **M5****Dooside manustamine**

19. Uuritavat kemikaali või kandeainet tuleks manustada viisil, mis on kõige asjakohasem inimese kokkupuute puhul, võttes arvesse metabolismiga ja katselooma kehas jaotumisega seotud teavet. Manustamisviis on tavaliselt suukaudne (näiteks sundsöötmise sondiga või sööda või joogivee kaudu), kuid kasutada võib ka muid manustamisviise (nt naha kaudu, sissehingamise teel), sõltuvalt kemikaali omadustest ning eeldatavast või teadaolevast kokkupuuteteest inimese puhul (täiendavad juhised on esitatud juhenddokumendis 43 (8)). Valitud manustamisviisi tuleks põhjendada. Uuritavat kemikaali tuleks manustada igal päeval ligikaudu samal ajal.
20. Iga looma doos peaks tavaliselt põhinema looma kõige viimasel individuaalselt kindlaksmääratud kehamassil. Tiinuse viimasel kolmandikul tuleks doosi määramisega olla siiski ettevaatlik. Kui emasloomadel, kellele manustati kemikaali, avalduvad liigse mürgistuse sümptomid, tuleks need loomad humaanselt tappa.
21. Uuritavat kemikaali või kandeainet tuleks paaritatud emasloomadele manustada vähemalt kord päevas alates loodete implantatsioonist (GD 6) kogu imetamise aja jooksul (kuni PND 21), nii et pojad puutuksid kemikaaliga kokku närvisüsteemi sünnieelse ja -järgse arengu jooksul. Nii dooside manustamise algust kui ka kestust ja sagedust võib muuta, kui tõendid osutavad, et katse teistsugune korraldus võiks inimese kokkupuudet arvestades olla asjakohasem. Muu liigi puhul tuleks dooside manustamise kestust kohandada, et tagada kokkupuude kemikaaliga aju arengu kõikidel varastel järkudel (s.o järkudel, mis vastavad inimaju sünnieelsele ja varasele sünnijärgsele kasvule). Dooside manustamine võib alata kohe tiinuse algusest (GD 0), kuigi tuleks silmas pidada võimalust, et kemikaal võib põhjustada embrüo hukkumise juba enne implantatsiooni. Manustamise alustamisega GD 6-st saaks seda riski vältida, kuid arengujärgud GD 0 — GD 6 jäävad siis kemikaaliga mõjutamata. Kui labor ostab teadaoleva tiinestumispäevaga tiineid loomi, on raske alustada dooside manustamist GD 0-st ja seega oleks hea päev alustamiseks GD 6. Katselabor peaks kehtestama dooside manustamise korra vastavalt uuritava kemikaali mõju käsitlevale asjakohasele teabele, varasematele kogemustele ja logistilistele kaalutlustele; see võib hõlmata dooside manustamist ka pärast võõrutamist. Doosi ei manustata poegimise päeval sellistele loomadele, kes ei ole veel kõiki järglasi sünnitanud. Üldiselt eeldatakse, et järglaste kokkupuude kemikaaliga toimub emapiima kaudu; kuid kui järglaste jätkuva kokkupuute kohta puuduvad tõendid, tuleks kaaluda kemikaali manustamist otse poegadele. Tõendeid järglaste katkematu kokkupuute kohta võib leida näiteks farmakokineetilise teabest, teabest mürgisuse kohta järglastele või biomarkerite muutustest (28).

VAATLUSED**Emasloomade jälgimine**

22. Kõiki emasloomi tuleks hoolikalt vaadelda vähemalt kord päevas, et hinnata nende tervises seisundit, sealhulgas haigestumust ja suremust.
23. Dooside manustamise ja vaatluste perioodil tuleks korrapäraselt teha üksikasjalikke kliinilisi vaatlusi (vähemalt kahel korral poegimiseeelsel manustamisperioodil ja kahel korral imetamisaegsel manustamisperioodil), kasutades vähemalt kümnet emaslooma iga doosimäära puhul. Loomi peaksid väljaspool kodupuuri vaatlema väljaõppinud spetsialistid, kes ei tea, et manustatakse kemikaali, ja kasutavad standarditud korda, et vähendada loomade stressi ja vaatleja erapoolikuse mõju ning saavutada vaatlejate arvamuste võimalikult hea kooskõla. Võimaluse korral on soovitatav, et ühe uuringu puhul teeks vaatlusi sama spetsialist.

▼ **M5**

24. Tähteldatud sümptomid tuleks registreerida. Võimaluse korral tuleks registreerida ka tähteldatud sümptomite intensiivsus. Kliinilised vaatlused peaksid hõlmama vähemalt järgmist: naha, karvkatte, silmade ja limaskestade muutused, eritiste esinemine, autonoomse närvisüsteemi aktiivsuse muutused (nt pisaravool, turris karv, pupilli suurus, muutunud hingamine ja/või suu kaudu hingamine, kõik urineerimise või roojamisega seotud ebatavalised sümptomid).
25. Kõik kehaasendi, aktiivsuse astme (nt standardala vähenenud või suurenenud uurimine) ning liigutuste koordinaatsiooni muutused tuleks samuti üles märkida. Muutused kõnnakus (nt taarumine, ataksia), kehaasendis (nt kükurus selg) ning reageerimises kättevõtmisele, mahapanemisele või muudele keskkonna stiimulitele ning klooniliste või tooniliste liigutuste, krampide või väärinate esinemine, stereotüübid (nt ülemäärane karvkatte eest hoolitsemine, ebatavalised pealiigutused, korduv tiirutamine) või veider käitumine (nt hammustamine või enda ülemäärane lakkumine, enesevigastamine, tagurpidi kõndimine, häälitsemine) või agressiivsus tuleks registreerida.
26. Toksilisuse märgid tuleks üles märkida koos ilmnemise päeva, kellaaja, sümptomite raskusastme ja kestusega.
27. Dooside manustamise ajal tuleks loomi kogu uuringu kestel kaaluda vähemalt üks kord nädalas, sünnituse päeval või selle läheduses ja päeval PND 21 (võõrutamine). Emasloomade sundsöötmise uuringute puhul tuleks loomi kaaluda vähemalt kaks korda nädalas. Doose tuleks sobivaks kohandada vastavalt igale kehahassi määramise tulemusele. Sööda tarbimist tuleks tiinuse ja imetamise ajal mõõta vähemalt iga nädal. Kui kemikaali manustatakse joogivee kaudu, tuleks vee tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas.

Järglaste jälgimine

28. Kõiki järglasi tuleks hoolikalt vaadelda vähemalt kord päevas, et teha kindlaks mürgistusnähud, haigestumus ja suremus.
29. Dooside manustamise ja vaatluste ajal tuleks teha järglaste üksikasjalikke kliinilisi vaatlusi. Järglasi (vähemalt üks loom kummastki soost ja igast pesakonnast) peaksid vaatlema väljaõppinud spetsialistid, kes ei tea, et manustatakse kemikaali, ja kasutavad standarditud korda, et vähendada vaatleja erapoolikuse mõju ning saavutada vaatlejate arvamuste võimalikult hea kooskõla. Võimaluse korral on soovitatav, et vaatlusi teeks sama spetsialist. Iga vaadeldava arengujärgu kohta tuleks jälgida vähemalt punktides 24 ja 25 kirjeldatud näitajaid.
30. Kõik järglaskonnas ilmnevad toksilisuse märgid tuleks üles märkida koos ilmnemise päeva, kellaaja, sümptomite raskusastme ja kestusega.

Füüsilised ja arengut iseloomustavad näitajad

31. Võõrutuseelse arengu näitajate (kõrvalesta tipu eemaldumine peast, silmade avanemine, lõikehamaste ilmumine) muutused korreleeruvad hästi kehahassiga (30, 31). Kehahass võib olla parim füüsilise arengu taseme näitaja. Arengu põhinäitajate mõõtmist soovitatakse seepärast ainult siis, kui on olemas varasemad tõendid selle kohta, et kõnealused näitajad annavad täiendavat teavet. Kõnealuste näitajate hindamise ajakava on esitatud tabelis 1. Sõltuvalt oodatavast mõjust ja esialgsete mõõtmiste tulemustest võib olla soovitatav lisada täiendavaid aegu või teha mõõtmisi muudes arengustaadiumides.

▼ M5

32. Füüsilise arengu hindamise korral on soovitatav kasutada paaritusjärgset, mitte sünnijärgset vanust (33). Kui poegadega tehakse katseid võõrutamise päeval, on soovitatav teha katsed enne võõrutushetke, et vältida võõrutamisega seotud stressi segavat mõju. Katseid ei tuleks teha ka kahel võõrutamisjärgsel päeval.

Tabel 1

Füüsiliste ja arengut iseloomustavate näitajate ning funktsionaalsete või käitumuslike näitajate hindamise ajakava ^(a)

Vanusejärgud	Võõrutuseelne ^(b)	Noorukiiga ^(b)	Noored täiskasvanud ^(b)
Näitajad			

Füüsilised ja arengut iseloomustavad näitajad

Kehamass ja kliinilised vaatlused	iga nädal ^(c)	vähemalt iga kahe nädala tagant	vähemalt iga kahe nädala tagant
Aju mass	PND 22 ^(d)		katse lõpetamisel
Neuropatoloogia	PND 22 ^(d)		katse lõpetamisel
Suguküpsuse saamine	—	vajaduse korral	—
Muud arengunäitajad ^(e)	vajaduse korral	—	—

Funktsionaalsed või käitumuslikud näitajad

Käitumise ontogenees	vähemalt kaks mõõtmist		
Motoorne aktiivsus (sh harjumine)	1–3 korda ^(f)	—	üks kord
Motoorne ja sensoorne funktsioon	—	üks kord	üks kord
Õppimine ja mälu	—	üks kord	üks kord

^(a) Selles tabelis on esitatud minimaalne mõõtmiskordade arv. Sõltuvalt oodatavast mõjust ja esialgsete mõõtmiste tulemustest võib olla soovitatav lisada täiendavaid aegu (näiteks vanad loomad) või teha mõõtmisi muudes arengustaadiumides.

^(b) Poegadega ei soovitata teha katseid kahel võõrutusjärgsel päeval (vt punkt 32). Soovitatav vanus noorloomadega katsete tegemiseks on järgmine: õppimine ja mälu — PND 25 ± 2; motoorne ja sensoorne funktsioon — PND 25 ± 2. Soovitatav vanus katsete tegemiseks noorte täiskasvanutega on PND 60–70.

^(c) Poegadele dooside otse manustamise korral tuleks kehamassi mõõta vähemalt kaks korda nädalas, et kohandada doose vastavalt kehamassi kiirele suurenemisele.

^(d) Aju massi ja neuropatoloogiat võib hinnata varasemal ajal (nt PND 11), kui see on sobiv (vt punkt 39).

^(e) Muud arengu näitajaid lisaks kehamassile (nt silmade avanemine) tuleb registreerida sündmuse toimumise ajal (vt punkt 31).

^(f) Vt punkt 35.

33. Elusad järglased tuleb üle lugeda ja määrata nende sugu, nt visuaalse vaatluse või anogenitaalse vahemaa määramisega (34, 35), ning iga poega pesakonnas tuleks kaaluda kohe pärast sündi või varsti selle järel, vähemalt kaks korda nädalas imetamise ajal ja vähemalt iga kahe nädala tagant pärast seda. Suguküpsuse saamise määramiseks tuleks igas pesakonnas vähemalt ühel isasloomal ja ühel emasloomal määrata vanus ja kehamass, kui neil toimub tupe avanemine (36) või eesnaha eraldumine (37).

▼ **M5****Käitumise ontogenees**

34. Valitud käitumisviisinäitajate arengut tuleks mõõta sobivas vanuses vähemalt ühel pojal kummastki soost igas pesakonnas, kusjuures kõigil katsepäevadel kasutatakse kõikide käitumisviisinäitajate määramiseks samu loomi. Mõõtmispäevad jaotatakse ühtlaselt üle vaatluste aja, et määrata normaalsete käitumisjoonte areng või nende muutused, mis on seotud dooside manustamisega (38). Hinnata võiks näiteks järgmiste käitumisjoonte kujunemist: õige kehaasendi taastamise refleks, negatiivne geotaksis ja motoorne aktiivsus (38, 39, 40).

Motoorne aktiivsus

35. Motoorset aktiivsust tuleks jälgida (41, 42, 43, 44, 45) võõrutuseelses vanuses ja täiskasvanuvanus. Katsete kohta võõrutamise ajal vt punkt 32. Katsete periood peab olema piisavalt pikk, et näidata kemikaaliga töötlemata kontrollrühmas katsete perioodi jooksul tekkivat harjumist. Käitumise ontogeneesi hindamiseks on väga soovitatav kasutada motoorse aktiivsuse hindamist. Kui seda kasutatakse käitumise ontogeneesi hindamiseks, tuleks kõikides võõrutuseelsetes katsetes kasutada samu loomi. Katseid tuleks teha piisava sagedusega, et demonstreerida katsete perioodi jooksul tekkivat harjumist (44). Selleks võib kuluda kolm sessiooni enne võõrutamist ja võõrutamise päeval (nt päevad PND 13, 17, 21). Samu ühe pesakonna loomi tuleks vaadelda ka täiskasvanueas enne katse lõpetamist (nt päevad PND 60–70). Katseid võib vajaduse korral teha ka lisapäevadel. Motoorset aktiivsust tuleks mõõta salvestusseadmega automatiseeritud aparadi abil, millega saab määrata nii tegevuse hoogustumist kui ka vähenemist (nt baastegevus, mida seadmega saab mõõta, ei tohiks olla nii vähene, et selle vähenemist ei õnnestu registreerida, ega nii hoogne, et selle edasist hoogustumist ei saa registreerida). Iga seadet tuleb kontrollida standardmeetodiga, et tagada võimalikkuse piires eri seadmete mõõtmiste ja eri päevadel toimuvate mõõtmiste usaldusväärsus. Doosirühmade loomad jaotatakse eri seadmete vahel võimalikult tasakaalustatult. Iga loomaga tuleks katseid teha eraldi. Doosirühmade katsed peavad toimuma tasakaalustatult eri aegadel, et tulemusi ei mõjutaks tegevuse ööpäevased rütmid. Tuleks püüda tagada, et katsetingimuste varieeruvus oleks võimalikult väike ja et ei esineks süstemaatilist viga. Paljude käitumisnäitajate mõõtmist mõjutavad sellised muutujad nagu müratase, katsepuuri kuju ja suurus, temperatuur, suhteline õhuniiskus, valgustustingimused, lõhnad, kodupuuri või uue katsepuuri kasutamine ja tähelepanu häirivad keskkonnatingimused.

Motoorne ja sensoorne funktsioon

36. Motoorset ja sensoorset funktsiooni tuleks üksikasjalikult uurida vähemalt üks kord noorkieas ja üks kord noore täiskasvanu eas (nt PND 60–70). Katsete tegemise kohta võõrutamise ajal vt punkt 32. Tuleb teha piisavalt katseid, et koguda vajalikud kvantitatiivsed andmed sensoorsete funktsioonide kohta (nt somatosensoorsed ja vestibulaarfunktsioonid) ja motoorsete funktsioonide kohta (nt jõud, koordineerimine). Mõned motoorsete ja sensoorsete funktsioonide näited on tõukerefleks (tallarefleks) (46), õige kehaasendi taastamise refleks (47, 48), ehmatava helisignaali harjumine (40, 49, 50, 51, 52, 53, 54) ja esilekutsutud võimed (55).

▼ M5

Õppimise ja mälu katsed

37. Assotsiatiivse õppimise ja mälu katse tuleks teha pärast võõrutamist (nt päeval 25 ± 2) ja noorte täiskasvanutega (PND 60 ja vanemad). Katsete kohta võõrutamise ajal vt punkt 32. Nende kahe arengutaseme puhul võib kasutada sama või eraldi katset. Võõrutatud poegade ja täiskasvanud rottide õppimise ja mälu katse(te) valimisel lubatakse teatavat paindlikkust. Katse(d) tuleks siiski kavandada selliselt, et oleksid täidetud kaks kriteeriumi. Esiteks, õppimist tuleks hinnata mitme korduva õppimiskatse või -sessiooni jooksul ilmnevate muutuste kaudu või ühtainukest ülesannet hõlmava katsega ja võrrelda seda kontrollkatsega, milles kontrollitakse õpetamiskatse võimalikke mitteassotsiatiivseid mõjusid. Teiseks peaksid katsed hõlmama mingil määral (lühiajalise või pikaajalise) mälu kasutamist, lisaks algselle äraõppimisele (omandamine), kuid seda mälu näitajat ei saa registreerida, kui sama katsega ei ole mõõdetud omandamise näitajat. Kui õppimise ja mälu katsetest ilmneb kemikaali mõju, tuleb kaaluda lisakatsete korraldamist, et jätta kõrvale alternatiivsed tõlgendused, mille aluseks on sensoorsed või motivatsioonilised muutused ja/või motoorse suutlikkuse muutumine. Lisaks eespool nimetatud kahele kriteeriumile on soovitatav, et õppimise ja mälu katse tuleks valida nii, et katse oleks tõendatult tundlik uuritava kemikaali suhtes, kui kirjandusest on kättesaadav kõnealune teave. Kui sellist teavet ei ole, võiksid selliste katsete näideteks, mida võib teha eespool kirjeldatud kriteeriumide täitmiseks, olla passiivne vältimine (43, 56, 57), viivitusega reageerimine asendile täiskasvanud roti (58) või rotipoja (59) puhul, haistmise kaudu mõjutamine (43, 60), Morrise veelabürindi katse (61, 62, 63), Bieli või Cincinnati labürindi katse (64, 65), radiaallabürindi katse (66), T-labürindi katse (43) ning ajakavast sõltuva käitumise omandamine ja säilitamine (26, 67, 68). Kirjanduses on kirjeldatud veel muid katseid võõrutatud rotipoegade (26, 27) ja täiskasvanud rottide jaoks (19, 20).

Surmamisjärgne uurimine

38. Emaloomad võib pärast järglaste võõrutamist surmata.
39. Järglaste neuropatoloogiliseks uurimiseks kasutatakse kudesid, mis on saadud loomadelt, kes on humaanselt surmatud päeval PND 22 või varem (PND 11 — PND 22) või katse lõpetamisel. Päeval PND 22 surmatud järglaste puhul tuleks hinnata ajukudesid; katse lõpetamisel surmatud loomade puhul tuleks hinnata nii kesknärvisüsteemi kudesid kui ka perifeerse närvisüsteemi kudesid. Päeval PND 22 või varem surmatud loomad võib fikseerida immersiooni või perfusiooniga. Katse lõpetamisel surmatud loomad tuleks fikseerida perfusiooniga. Koenäidiste ettevalmistamisel tuleks kõikidel etappidel — loomade perfusioon, kudede väljalõikamine, kudede töötlemine ja mikroskoobipreparaatide värvimine — kasutada tasakaalustatud katsekorraldust, nii et igas partiis oleks iga doosirühma esindav valim. Täiendavad suunised neuropatoloogia kohta on esitatud OECD juhenddokumendis nr 20 (9), vt ka (103).

Koeproovide töötlemine

40. Kõik lahkamise ajal märgatavad suured kõrvalekalded tuleks üles märkida. Võetud koeproovid peaksid esindama kõiki peamisi närvisüsteemi piirkondi. Koeproove tuleks säilitada sobivas fiksaatoris ja neid tuleks töödelda vastavalt avaldatud standardsetele histoloogiajuhenditele (69, 70, 71, 103). Parafiinis konserveerimine on sobiv kesk- ja perifeerse närvisüsteemi kudede

▼ M5

puhul, kuid osmiumi kasutamine järelfikseerimiseks koos epoksükonserveerimisega võib olla sobiv, kui on vaja saavutada parem lahutusvõime (nt perifeersetel närvide puhul, kui kahtlustatakse perifeerset neuropaatiat ja/või perifeersetel närvide morfomeetriliseks analüüsiks). Morfomeetriliseks analüüsiks kogutav ajukude tuleks kõikide doosirühmade puhul paigutada sobivasse säilituskeskkonda samal ajal, et vältida kokkutõmbumisest tingitud artefakte, mis võivad kaasneda pikaajalise säilitamisega fiksaatoris (6).

Neuropatoloogiline uuring

41. Kvalitatiivse uuringu eesmärgid on järgmised:
 - i) teha kindlaks närvüsteemi piirkonnad, milles esineb nähtavaid neuropatoloogilisi muutusi;
 - ii) teha kindlaks, millist tüüpi neuropatoloogilised muutused tulenevad kokkupuutest uuritava kemikaaliga, ning
 - iii) määrata neuropatoloogiliste muutuste ulatus raskusastme järgi.

Koeproovidest saadud representatiivseid histoloogilisi lõikeid peaks mikroskoobiga uurima nõuetekohaselt koolitatud patoloog, et leida tõendeid neuropatoloogiliste muutuste kohta. Iga neuropatoloogilisele muutusele tuleks subjektiivse hindamiskaala alusel omistada raskusaste. Värvimine hematoksüliini ja eosiiniga võib olla piisav, et hinnata päeval PND 22 või varem humaanselt surmatud loomade aju lõikeid. Katse lõpetamisel surmatud loomade kesknärvüsteemi ja perifeerse närvüsteemi lõigete uurimiseks soovitakse kasutada aga müeliinivärve (nt *Luxol fast blue*/kresüülviolet) ja hõbedapõhiseid värve (nt Bielschowsky või Bodian'i värv). Vastavalt patoloogi eksperthinnangule ja võttes arvesse täheldatud muutusi, võib kasutada muid sobivaid värve, et teha kindlaks ja iseloomustada teatavat tüüpi muutusi (nt gliiafibrillide happelise proteiini (GFAP) või lektiini histokeemia, et hinnata gliia ja mikroglia muutusi (72), fluorojadeiit-värv nekroosi tuvastamiseks (73, 74) või närvide degeneratsiooni suhtes spetsiifiline hõbedapõhine värv (75)).

42. Tuleks teha morfomeetriline (kvantitatiivne) hindamine, kuna need andmed võivad aidata tuvastada kokkupuutega seotud mõju ja on väärtuslikud kemikaaliga kokkupuutest tingitud ajumassi või aju morfoloogia erinevuste tõlgendamisel (76, 77). Närvikoest tuleks võtta proovid ja valmistada need ette morfomeetriliseks hindamiseks. Morfomeetriline hindamine võib hõlmata näiteks aju teatavate piirkondade joonmõõtmete või pindala määramist (78). Joonmõõtmete või pindala määramiseks on vaja kasutada homoloogseid lõikeid, mis on hoolikalt valitud usaldusväärsete mikroskoopiliste punktide järgi (6). Et tuvastada kemikaaliga kokkupuute mõju sellistele näitajatele nagu teatava neuroanatomilise piirkonna maht või rakkude arv, võib kasutada stereoloogiat (79, 80, 81, 82, 83, 84).
43. Ajus tuleks otsida tõendeid neuropatoloogiliste muutuste kohta, mis on seotud dooside manustamisega, ja piisavad näidised tuleks võtta kõikidest peamistest aju piirkondadest (nt haistmissibulad, ajukoor, hipokamp, basaalganglionid, talamus, hüpotalamus, keskaju (*tectum*, *tegmentum* ja *ajuvarred*), ajusild, piklikaju, väikeaju), et läbivaatamine oleks põhjalik. On oluline, et kõigilt loomadelt võetaks lõiked samas tasapinnas. Katse lõpetamisel humaanselt surmatud täiskasvanud loomadelt tuleks võtta seljaaju ja perifeerse närvüsteemi representatiivsed lõiked. Uuritavad alad peaksid hõlmama silma koos nägemisnärvi ja võrkkestaga, seljaaju kaela- ja nimme-tüve kohal, selgmisi ja kõhtmisi närvijuuri, proksimaalset istmikunärvi, proksimaalset säärenärvi (põlve juures) ja säärenärvi sääremarjalihase harusid. Seljaajust ja perifeersest närvist tuleks teha nii rist- kui ka pikilõiked.

▼ **M5**

44. Neuropatoloogilisel hindamisel tuleks otsida närvisüsteemi arenguhäirete tunnuseid (6, 85, 86, 87, 88, 89), lisaks rakulistele muutustele (nt närvirakkude vakuolisatsioon, degeneratsioon, nekroos) ja koemuutustele (nt gliosis, leukotsüütide infiltratsioon, tsüstide moodustumine). Sellega seoses on oluline, et dooside manustamisega seotud muutusi tuleb eristada tavalistest arenguga seotud muutustest, mis peaksid toimuma looma surmamise ajaks (90). Arengu häirumisele viitavad muu hulgas näiteks järgmised leiud:

- haistmissibulate, aju või väikeaju üldsuuruse või kuju muutused;
- aju eri piirkondade suhtelise suuruse muutused, sealhulgas sellised aju piirkondade suuruse muutused, mis on tingitud tavaliselt ajutiste raku populatsioonide või aksonite väljakasvude kaotsiminekest või püsima jäämisest (nt väikeaju väline germinaalkiht, mõhnkeha);
- muutused rakkude paljunemises, migreerumises ja diferentseerimises, millele osutab ülemäärane apoptoos või nekroos, väärasetsusega, valesuunaliste või vääralt moodustunud närvirakkude kogumid või hajutatud populatsioonid või muutused ajukoorestruktuuride kihtide suhtelises suuruses;
- muutused müeliniseerumises, sealhulgas müeliiniga kaetud struktuuride muutunud üldsuurus või värvumine;
- vesipea tunnused, eelkõige vatsakeste suurenemine, ajuveejuha ahenemine ja ajupoolkerade õhenemine.

Neuropatoloogiliste muutuste doosi ja toime vahelise sõltuvuse analüüsimine

45. Kvalitatiivse ja kvantitatiivse neuropatoloogilise analüüsi puhul soovitatakse toimida järgmiselt. Esiteks võrreldakse suure doosi rühma loomade löikeid kontrollrühma loomade löigetega. Kui suure doosi rühma loomadel neuropatoloogilisi muutusi ei leita, ei ole täiendav analüüs vajalik. Kui suure doosi rühmadel loomadel leitakse neuropatoloogilisi muutusi, uuritakse keskmise ja madala doosi rühmade loomi. Kui katse suure doosi rühmaga lõpetatakse loomade surma või muu segava mürgistuse tõttu, tuleks suure ja keskmise doosi rühma loomadel uurida neuropatoloogilisi muutusi. Kui väiksema doosi rühma loomadel esineb tunnuseid, mis viitavad kemikaali neurotoksilisusele, tuleks neuropatoloogiline analüüs teha osutatud rühmade loomadega. Kui kvalitatiivse või kvantitatiivse vaatlusega leitakse dooside manustamisega seotud neuropatoloogilisi muutusi, tuleks määrata kõikide kahjustuste või morfoomeetriliste muutuste esinemise, sageduse ja raskusastme sõltuvus doosist, kasutades kõikide doosirühmade loomade vaatluse andmeid. Hindamine peaks hõlmama kõiki ajupiirkondi, milles on leitud neuropatoloogilisi muutusi. Iga kahjustuste tüübi puhul tuleks kirjeldada näitajaid, mille alusel määrati raskusaste, sealhulgas omadused, mida kasutati raskusastmete eristamiseks. Iga tüüpi kahjustuste ja nende raskusastmete esinemissagedus tuleks registreerida ja teha statistiline analüüs, et hinnata doosi ja toime vahelise sõltuvuse laadi. Soovitatakse kasutada koodmärgisega varustatud mikroskoobipreparaate (91).

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Andmed

46. Andmed tuleks esitada iga looma kohta ja samuti kokkuvõtliku tabelina, milles iga katserühma kohta näidatakse muutuste tüübid ning iga tüübi puhul emasloomade, järglaste (eraldi kummastki soost) ja pesakondade arv, kellele see esines. Kui järglased viiakse pärast sündi otse kokkupuutesse kemikaaliga, tuleb teatada kokkupuuteviis, kestus ja kokkupuute ajavahemik.

▼ **M5****Tulemuste hindamine ja tõlgendamine**

47. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuring annab teavet selle kohta, millist mõju avaldab korduv sünnieelne ja varane sünnijärgne kokkupuude kemikaaliga. Kuna rõhk on pandud nii üldise mürgisuse kui ka arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse näitajate määramisele, võimaldavad katsetulemused teha vahet järglaste arengu häireid põhjustaval neurotoksilisusel, kui üldist mürgistust emaloomal veel ei täheldata, ja sellisel arenguhäireid põhjustaval neurotoksilisusel, mis avaldub ainult kontsentratsioonil, mis on mürgine ka emaloomale. Kuna seosed katse kavandamise, andmete statistilise analüüsi ja bioloogilise olulisuse vahel on keerulised, kasutatakse arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuringu andmete õigeaks tõlgendamiseks eksperdi hinnanguid (107, 109). Katsetulemuste tõlgendamisel kasutatakse tõendite kaalukusel põhinevat lähenemisviisi (20, 92, 93, 94). Arutada tuleks käitumuslike ja morfoloogiliste leidude tüüpe ning doosi ja toime vahelist sõltuvust. Sellise iseloomustuse koostamisel tuleks kasutada kõiki andmeid arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse kohta, sealhulgas inimeste epidemioloogilisi uuringuid või juhtumiaruandeid ja katseloomade uuringuid (nt toksiko-kineetilised andmed, struktuuri-aktiivsuse sõltuvused, muude toksikoloogiauringute andmed). See hõlmab seost uuritava kemikaali doosi ja neurotoksilise mõju olemasolu või puudumise, esinemissageduse ja raskusastme vahel kummagi soo puhul (20, 95).
48. Andmete hindamisel tuleks arutada nii bioloogilist kui ka statistilist tähtsust. Statistilist analüüsi tuleks vaadelda kui vahendit, mis suunab andmete tõlgendamist, kuid ei määra seda. Statistilise olulisuse puudumine ei tohiks olla ainus põhjendus järeldamiseks, et kokkupuude kemikaaliga ei avalda mõju, ja statistiline olulisus ei saa olla ainus põhjendus, millest järeldatakse, et kemikaal avaldab mõju. Et hoiduda võimaliku valenegatiivse järelduse tegemisest ja kuna „mõju puudumise” tõendamine on juba põhimõtteliselt raske, tuleks arutada kõiki olemasolevaid andmeid mõju olemasolu kohta ja varasema kontrolli andmeid, eriti kui katse näitas, et dooside manustamine mõju ei avalda (102, 106). Valepositiivse järelduse tõenäosust tuleks arutada kõikide andmete statistilise hindamise põhjal (96). Hindamisel tuleks vaadelda neuropatoloogiliste ja käitumuslike muutuste vahelist seost, kui täheldati mingeid muutusi.
49. Kõigi andmete analüüsimisel tuleb kasutada statistilisi mudeleid, milles arvestatakse katse korraldust (108). Parameetrilise või mitteparameetrilise analüüsi valimine peaks olema põhjendatud, võttes arvesse selliseid tegureid nagu andmete laad (otsesed või teisendatud andmed) ja nende jaotust, samuti valitud statistilise analüüsi meetodi suhtelist stabiilsust. Lähtudes uuringu eesmärgist ja katse kavast, tuleks statistilise analüüsi meetod valida nii, et viia miinimumini I tüüpi (valepositiivse) vea ja II tüüpi (valenegatiivse) vea võimalikkus (96, 97, 104, 105). Kui arengu-uuringus kasutatakse loomaliiki, kelle pesakonnas on mitu poega, kellega tehakse katseid, tuleks statistilises mudelis vaadelda pesakonda, et vältida I tüüpi vea võimaluse olulist suurenemist (98, 99, 100, 101). Statistiline mõõtmisühik peaks sel juhul olema pesakond ja mitte poeg. Katsed peaksid olema kavandatud nii, et ühe pesakonna liikmeid ei käsitataks sõltumatute vaatlusaluste loomadena. Kui ühe ja sama vaatlusobjekti põhjal määratakse mitut näitajat, tuleks nende näitajate analüüsiks kasutada statistilisi mudeleid, milles võetakse arvesse, et mõõtmised ei ole sõltumatud.

Katseprotokoll

50. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

— füüsiline olek ja vajaduse korral füüsikalised-keemilised omadused;

— identifitseerimisandmed, sh päritolu;

▼ **M5**

— preparaadi puhtus ja teadaolevad või eeldatavad lisandid.

Kandeaine (vajaduse korral):

— kandeaine valiku põhjendamine, kui kandeaineks ei ole vesi või füsioloogiline soolalahus.

Katseloomad:

— kasutatud loomaliik ja liin, ning põhjendus, kui see on muu kui rott;

— katseloomade tarnija;

— loomade arv, vanus katse alguses ja sugu;

— päritolu, pidamistingimused, sööt, vesi jne;

— iga looma mass katse alguses.

Katsetingimused:

— doositaseme valimise põhjendus;

— dooside manustamise tee ja ajavahemiku põhjendus;

— manustatavate dooside üksikasjad, sh kandeaine, mahu ja manustatava aine füüsilise vormi üksikasjad;

— üksikasjad uuritava kemikaali koostise/söödavalmistise kohta, valmistises saavutatud kontsentratsiooni, stabiilsuse ja homogeensuse kohta;

— meetod, mida kasutati emaloomade ja järglaste kordumatuks märgistamiseks;

— üksikasjalik randomiseerimismeetodi(te) kirjeldus: kuidas juhuslikkuse alusel jaotati emaloomad doosirühmadesse, valiti välja järglased surmamiseks ja määrati järglased katserühmadesse;

— uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;

— vajaduse korral söödas/joogivees või sissehingatavas õhus oleva uuritava kemikaali kontsentratsiooni (ppm) teisendus tegelikuks päevadoosiks (mg kehamassi kg kohta);

— keskkonningimused;

— üksikasjad sööda ja vee kvaliteedi kohta (nt kraanivesi, destilleeritud vesi);

— uuringu alustamise ja lõpetamise kuupäevad.

Vaatlused ja katsemeetodid:

— üksikasjalik meetodi kirjeldus: kuidas standarditi leiud jm protseduurid, samuti märgatud leidudele hindepunktide andmise tööjuhendid;

— kõikide katses kasutatud meetodite loetelu ja nende kasutamise põhjendused;

— kõikide kasutatud käitumuslike, funktsionaalsete, patoloogia-, neurokeemia või elektrofüsioloogiameetodite üksikasjad, sealhulgas teave automaatseadmete kohta;

— seadmete kaliibrimise meetodid, seadmete samaväärsuse tagamine ja doosirühmade tasakaalustatud jaotamine katsete tegemisel;

— lühike selgitus kõigi otsuste kohta, milles kasutati eksperdi hinnanguid.

▼ **M5**

Tulemused (individuaalsed tulemused ja nende kokkuvõte, sealhulgas võimaluse korral keskvääratus ja dispersioon):

- loomade arv uuringu alguses ja uuringu lõpus;
- iga katsemeetodi puhul kasutatud loomade ja pesakondade arv;
- iga looma identifitseerimisnumber ja pesakond, millest loom on pärit;
- pesakonna suurus ja sünnijärgne keskmine mass sugude kaupa;
- kehamassi ja selle muutuse andmed, sealhulgas emaloomade ja järglaste lõplik kehamass;
- sööda tarbimise ja vajaduse korral vee tarbimise andmed (nt kui uuritavat ainet manustatakse vee kaudu);
- toksilist reaktsiooni käsitlevad andmed sugude ja doosimäärade kaupa, sh surma aeg ja põhjus, kui see on asjakohane;
- toksilisuse laad, raskusaste, kestus, avaldumise päev, kellaaeg, ja edasiste üksikasjalike kliiniliste vaatluste käik;
- arengu iga olulise näitaja (kehamass, suguküpsuse saabumine ja käitumise ontogenees) hindepunktide arv igal vaatlusel;
- kõikide käitumisega seotud, funktsionaalsete, neuropatoloogiliste, neurokeemiliste, elektrofüsioloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus sugude kaupa, sealhulgas nii suurenemised kui ka vähenemised, võrreldes kontrollrühmadega;
- lahkamise tulemused;
- aju mass;
- neurooloogiliste tunnuste põhjal pandud diagnoosid ja oletatud kahjustused, sealhulgas looduslikult esinevad haigused või haigusseisundid;
- tüüpiliste muutuste fotod;
- madala lahutusvõimega kujutised, et oleks võimalik hinnata morfomeetriaks kasutatud lõigete homoloogsust;
- andmed absorptsiooni ja metabolismi kohta, sh täiendavad andmed eraldi toksiko-kineetilise uuringust, kui need on olemas;
- tulemuste statistiline analüüs koos andmete analüüsiks kasutatud statistiliste mudelitega ja tulemused, sõltumata sellest, kas need olid olulised või mitte;
- uuringust osavõtnute loetelu koos väljaõppe näitamisega.

Tulemuste arutelu:

- teave doosi ja selle mõju kohta, sugude ja rühmade kaupa;
- muude toksiliste mõjude (sugude ja rühmade kaupa) seos uuritud keemikaali võimaliku neurotoksilisuse kohta tehtud järeldusega;
- toksiko-kineetilise teabe mõju järeldustele;
- mõju võrdlus muude tuntud neurotoksiliste ainete mõjuga ja mõju sarnasus;

▼ **M5**

- andmed, mis kinnitavad katsemeetodi usaldusväärsust ja tundlikkust (st positiivsed ja varasemad kontrolli andmed);
- seosed neuropatoloogilise ja funktsionaalse mõju vahel, kui on seoseid;
- NOAEL või võrdlusdoos emaloomade ja järglaste puhul, sugude ja rühmade kaupa.

Järeldused:

- tulemustega saadud andmete üldise tõlgendamise arutelu, sealhulgas järeldus, kas uuritav kemikaal on arenguhäireid põhjustav neurotoksiline aine, ja täheldatav kahjuliku toimeteta doos.

KIRJANDUS

- 1) OECD (1995). Draft Report of the OECD *Ad Hoc* Working Group on Reproduction and Developmental Toxicity. Copenhagen, Denmark, 13–14 June 1995.
- 2) US EPA (1998). U.S. Environmental Protection Agency Health Effects Test Guidelines. OPPTS 870.6300. Developmental Neurotoxicity Study. US EPA 712-C-98–239. Vt: [http://www.epa.gov/opptsfrs/OPPTS_Harmonized/870_Health_Effects_Test_Guidelines/Series/].
- 3) US EPA (1998). Guidelines for Neurotoxicity Risk Assessment. US EPA 630/R-95/001F. Vt: [<http://cfpub.epa.gov/ncea/cfm/recordisplay.cfm?Print-Version=True&deid=12479>].
- 4) Cory-Slechta, D.A., Crofton, K.M., Foran, J.A., Ross, J.F., Sheets, L.P., Weiss, B., Mileson, B. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: I. Behavioral effects. *Environ. Health Perspect.*, 109:79–91.
- 5) Dorman, D.C., Allen, S.L., Byczkowski, J.Z., Claudio, L., Fisher, J.E. Jr., Fisher, J.W., Harry, G.J., Li, A.A., Makris, S.L., Padilla, S., Sultatos, L.G., Mileson, B.E. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: III. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. *Environ. Health Perspect.*, 109:101–111.
- 6) Garman, R.H., Fix, A.S., Jortner, B.S., Jensen, K.F., Hardisty, J.F., Claudio, L., Ferenc, S. (2001). Methods to identify and characterize developmental neurotoxicity for human health risk assessment: II. Neuropathology. *Environ. Health Perspect.*, 109:93–100.
- 7) OECD (2003). Report of the OECD Expert Consultation Meeting on Developmental Neurotoxicity Testing. Washington D.C., US, 23–25 October 2000.
- 8) OECD (2008). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 43. Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment. Environment Directorate, OECD, Paris. July 2008. Vt: [[http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2008\)16&doclanguage=en](http://search.oecd.org/officialdocuments/displaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2008)16&doclanguage=en)].
- 9) OECD (2003). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No. 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Environment Directorate, OECD, Paris, September 2003. Vt: [http://www.oecd.org/document-1/22/0,2340,en_2649_34377_1916054_1_1_1_1,00.html].
- 10) Kimmel, C.A., Rees, D.C., Francis, E.Z. (1990) Qualitative and quantitative comparability of human and animal developmental neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12: 173–292.
- 11) Spencer, P.S., Schaumburg, H.H., Ludolph, A.C. (2000) *Experimental and Clinical Neurotoxicology, 2nd Edition*, ISBN 0195084772, Oxford University Press, New York.

▼ M5

- 12) Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., Rice, D. (2002) Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. Rev.* 8:188–197.
- 13) Slikker, W.B., Chang, L.W. (1998) *Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1st Edition*, ISBN 0126488606, Academic Press, New York.
- 14) Käesoleva lisa peatükk B.34. Ühe põlvkonna reproduktsioonitoksilisuse uuring.
- 15) Käesoleva lisa peatükk B.35. Kahe põlvkonna reproduktsioonitoksilisuse uuring.
- 16) Käesoleva lisa peatükk B.43. Neurotoksilisuse uuring nariistel.
- 17) Käesoleva lisa peatükk B.31. Sünnieelse arengu mürgisuse uurimus.
- 18) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).
- 19) WHO (1986) *Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals*, (Environmental Health Criteria 60), Albany, New York: World Health Organization Publications Center, USA. Vt: [<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc060.htm>].
- 20) WHO (2001) *Neurotoxicity Risk Assessment for Human Health: Principles and Approaches*, (Environmental Health Criteria 223), World Health Organization Publications, Geneva. Vt: [<http://www.intox.org/databank/documents/supplem/supp/ehc223.htm>].
- 21) Chang, L.W., Slikker, W. (1995) *Neurotoxicology: Approaches and Methods, 1st Edition*, ISBN 012168055X, Academic Press, New York.
- 22) De Cabo, C., Viveros, M.P. (1997) Effects of neonatal naltrexone on neurological and somatic development in rats of both genders. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:499–509.
- 23) Agnish, N.D., Keller, K.A. (1997) The rationale for culling of rodent litters. *Fundam. Toxic. Appl. Toxicol.*, 38:2–6.
- 24) Avery, D.L., Spyker, J.M. (1977) Foot tattoo of neonatal mice. *Lab. Animal Sci.*, 27:110–112.
- 25) Wier, P.J., Guerriero, F.J., Walker, R.F. (1989) Implementation of a primary screen for developmental neurotoxicity. *Fundam. Toxic. Appl. Toxicol.*, 13:118–136.
- 26) Spear, N.E., Campbell, B.A. (1979) *Ontogeny of Learning and Memory*. ISBN 0470268492, Erlbaum Associates, New Jersey.
- 27) Krasnegor, N.A., Blass, E.M., Hofer, M.A., Smotherman, W. (1987) *Perinatal Development: A Psychobiological Perspective*. Academic Press, Orlando.
- 28) Zoetis, T., Walls, I. (2003) *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*. ILSI Press, Washington, DC.
- 29) Moser, V., Walls, I., Zoetis, T. (2005) Direct dosing of preweaning rodents in toxicity testing and research: Deliberations of an ILSI RSI expert working group. *Int. J. Toxicol.*, 24:87–94.
- 30) Conolly, R.B., Beck, B.D., Goodman, J.I. (1999) Stimulating research to improve the scientific basis of risk assessment. A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *Sci.*, 49: 1–4.
- 31) ICH (1993) ICH Harmonised Tripartite Guideline: Detection of Toxicity to Reproduction for Medical Products (S5 A). International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use.
- 32) Lochry, E.A. (1987) Concurrent use of behavioral/functional testing in existing reproductive and developmental toxicity screens: Practical considerations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 6:433–439.

▼ M5

- 33) Tachibana, T., Narita, H., Ogawa, T., Tanimura, T. (1998) Using postnatal age to determine test dates leads to misinterpretation when treatments alter gestation length, results from a collaborative behavioral teratology study in Japan. *Neurotoxicol. Teratol.*, 20:449–457.
- 34) Gallavan, R.H. Jr., Holson, J.F., Stump, D.G., Knapp, J.F., Reynolds, V.L. (1999) Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. *Reprod. Toxicol.*, 13:383–390.
- 35) Gray, L.E. Jr., Ostby, J., Furr, J., Price, M., Veeramachaneni, D.N., Parks, L. (2000) Perinatal exposure to the phthalates DEHP, BBP, and DINP, but not DEP, DMP, or DOTP, alters sexual differentiation of the male rat. *Toxicol. Sci.*, 58:350–365.
- 36) Adams, J., Buelke-Sam, J., Kimmel, C.A., Nelson, C.J., Reiter, L.W., Sobotka, T.J., Tilson, H.A., Nelson, B.K. (1985) Collaborative behavioral teratology study: Protocol design and testing procedure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:579–586.
- 37) Korenbrot, C.C., Huhtaniemi, I.T., Weiner, R.W. (1977) Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. *Biol. Reprod.*, 17:298–303.
- 38) Spear, L.P. (1990) Neurobehavioral assessment during the early postnatal period. *Neurotoxicol. Teratol.*, 12:489–95.
- 39) Altman, J., Sudarshan, K. (1975) Postnatal development of locomotion in the laboratory rat. *Anim. Behav.*, 23:896–920.
- 40) Adams, J. (1986) Methods in Behavioral Teratology. Vt: *Handbook of Behavioral Teratology*. Riley, E.P., Vorhees, C.V. (eds.) Plenum Press, New York, pp. 67–100.
- 41) Reiter, L.W., MacPhail, R.C. (1979) Motor activity: A survey of methods with potential use in toxicity testing. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:53–66.
- 42) Robbins, T.W. (1977) A critique of the methods available for the measurement of spontaneous motor activity, *Handbook of Psychopharmacology*, Vol. 7, Iverson, L.L., Iverson, D.S., Snyder, S.H., (eds.) Plenum Press, New York, pp. 37–82.
- 43) Crofton, K.M., Peele, D.B., Stanton, M.E. (1993) Developmental neurotoxicity following neonatal exposure to 3,3'-iminodipropionitrile in the rat. *Neurotoxicol. Teratol.*, 15:117–129.
- 44) Ruppert, P.H., Dean, K.F., Reiter, L.W. (1985) Development of locomotor activity of rat pups in figure-eight mazes. *Dev. Psychobiol.*, 18:247–260.
- 45) Crofton, K.M., Howard, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reiter, L.W., Tilson, H.A., MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13:599–609.
- 46) Ross, J. F., Handley, D. E., Fix, A. S., Lawhorn, G. T., Carr, G. J. (1997) Quantification of the hind-limb extensor thrust response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 19:1997. 405–411.
- 47) Handley, D.E., Ross, J.F., Carr, G.J. (1998) A force plate system for measuring low-magnitude reaction forces in small laboratory animals. *Physiol. Behav.*, 64:661–669.
- 48) Edwards, P.M., Parker, V.H. (1977) A simple, sensitive, and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 40:589–591.
- 49) Davis, M. (1984) The mammalian startle response. Vt: *Neural Mechanisms of Startle Behavior*, Eaton, R.C. (ed), Plenum Press, New York, pp. 287–351
- 50) Koch, M. (1999) The neurobiology of startle. *Prog. Neurobiol.*, 59:107–128.
- 51) Crofton, K.M. (1992) Reflex modification and the assessment of sensory dysfunction. In *Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicology*, Tilson, H., Mitchell, C. (eds). Raven Press, New York, pp. 181–211.

▼ M5

- 52) Crofton, K.M., Sheets, L.P. (1989) Evaluation of sensory system function using reflex modification of the startle response. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:199–211.
- 53) Crofton, K.M., Lassiter, T.L., Rebert, C.S. (1994) Solvent-induced ototoxicity in rats: An atypical selective mid-frequency hearing deficit. *Hear. Res.*, 80:25–30.
- 54) Ison, J.R. (1984) Reflex modification as an objective test for sensory processing following toxicant exposure. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 6:437–445.
- 55) Mattsson, J.L., Boyes, W.K., Ross, J.F. (1992) Incorporating evoked potentials into neurotoxicity test schemes. *Vt: Target Organ Toxicology Series: Neurotoxicity*, Tilson, H., Mitchell, C., (eds.), Raven Press, New York. pp. 125–145.
- 56) Peele, D.B., Allison, S.D., Crofton, K.M. (1990) Learning and memory deficits in rats following exposure to 3,3'-iminopropionitrile. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 105:321–332.
- 57) Bammer, G. (1982) Pharmacological investigations of neurotransmitter involvement in passive avoidance responding: A review and some new results. *Neurosci. Behav. Rev.*, 6:247–296.
- 58) Bushnell, P.J. (1988) Effects of delay, intertrial interval, delay behavior and trimethyltin on spatial delayed response in rats. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:237–244.
- 59) Green, R.J., Stanton, M.E. (1989) Differential ontogeny of working memory and reference memory in the rat. *Behav. Neurosci.*, 103:98–105.
- 60) Kucharski, D., Spear, N.E. (1984) Conditioning of aversion to an odor paired with peripheral shock in the developing rat. *Develop. Psychobiol.*, 17:465–479.
- 61) Morris, R. (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J. Neurosci. Methods*, 11:47–60.
- 62) Brandeis, R., Brandys, Y., Yehuda, S. (1989) The use of the Morris water maze in the study of memory and learning. *Int. J. Neurosci.*, 48:29–69.
- 63) D'Hooge, R., De Deyn, P.P. (2001) Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res. Rev.*, 36:60–90.
- 64) Vorhees, C.V. (1987) Maze learning in rats: A comparison of performance in two water mazes in progeny prenatally exposed to different doses of phenytoin. *Neurotoxicol. Teratol.*, 9:235–241.
- 65) Vorhees, C.V. (1997) Methods for detecting long-term CNS dysfunction after prenatal exposure to neurotoxins. *Drug Chem. Toxicol.*, 20:387–399.
- 66) Akaike, M., Tanaka, K., Goto, M., Sakaguchi, T. (1988) Impaired Biel and Radial arm maze learning in rats with methyl-nitrosurea induced microcephaly. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10:327–332.
- 67) Cory-Slechta, D.A., Weiss, B., Cox, C. (1983) Delayed behavioral toxicity of lead with increasing exposure concentration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 71:342–352.
- 68) Campbell, B.A., Haroutunian, V. (1981) Effects of age on long-term memory: Retention of fixed interval responding. *J. Gerontol.*, 36:338–341.
- 69) Fix, A.S., Garman, R.H. (2000) Practical aspects of neuropathology: A technical guide for working with the nervous system. *Toxicol. Pathol.*, 28: 122–131.
- 70) Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J.B., Sobin, L.H. (1994) *Laboratory Methods in Histotechnology*, American Registry of Pathology, Washington, DC, pp. 84–107.
- 71) Bancroft, J.D., Gamble, M. (2002) *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th edition, Churchill Livingstone, London.

▼ M5

- 72) Fix, A.S., Ross, J.F., Stitzel, S.R., Switzer, R.C. (1996) Integrated evaluation of central nervous system lesions: stains for neurons, astrocytes, and microglia reveal the spatial and temporal features of MK-801-induced neuronal necrosis in the rat cerebral cortex. *Toxicol. Pathol.*, 24: 291–304.
- 73) Schmued, L.C., Hopkins, K.J. (2000) Fluoro-Jade B: A high affinity tracer for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.*, 874:123–130.
- 74) Krinke, G.J., Classen, W., Vidotto, N., Suter, E., Wurmlin, C.H. (2001) Detecting necrotic neurons with fluoro-jade stain. *Exp. Toxic. Pathol.*, 53:365–372.
- 75) De Olmos, I.S., Beltramino, C.A., and de Olmos de Lorenzo, S. (1994) Use of an amino-cupric-silver technique for the detection of early and semiacute neuronal degeneration caused by neurotoxicants, hypoxia and physical trauma. *Neurotoxicol. Teratol.*, 16, 545–561.
- 76) De Groot, D.M.G., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Pakkenberg, B., Pelgrim, M.T.M., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Waanders, M.M., Gundersen, H.J. (2005a) Regulatory developmental neurotoxicity testing: A model study focusing on conventional neuropathology endpoints and other perspectives. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 19:745–755.
- 77) De Groot, D.M.G., Hartgring, S., van de Horst, L., Moerkens, M., Otto, M., Bos-Kuijpers, M.H.M., Kaufmann, W.S.H., Lammers, J.H.C.M., O'Callaghan, J.P., Waalkens-Berendsen, I.D.H., Pakkenberg, B., Gundersen, H.J. (2005b) 2D and 3D assessment of neuropathology in rat brain after prenatal exposure to methylazoxymethanol, a model for developmental neurotoxicity. *Reprod. Toxicol.*, 20:417–432.
- 78) Rodier, P.M., Gramann, W.J. (1979) Morphologic effects of interference with cell proliferation in the early fetal period. *Neurobehav. Toxicol.*, 1:129–135.
- 79) Howard, C.V., Reed, M.G. (1998) *Unbiased Stereology: Three-Dimensional Measurement in Microscopy*, Springer-Verlag, New York.
- 80) Hyman, B.T., Gomez-Isla, T., Irizarry, M.C. (1998) Stereology: A practical primer for neuropathology. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, 57: 305–310.
- 81) Korbo, L., Andersen, B.B., Ladefoged, O., Møller, A. (1993) Total numbers of various cell types in rat cerebellar cortex estimated using an unbiased stereological method. *Brain Res.*, 609: 262–268.
- 82) Schmitz, C. (1997) Towards more readily comprehensible procedures in disector stereology. *J. Neurocytol.*, 26:707–710.
- 83) West, M.J. (1999) Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: Issues of precision and bias. *Trends Neurosci.*, 22:51–61.
- 84) Schmitz, C., Hof, P.R. (2005) Design-based stereology in neuroscience. *Neuroscience*, 130: 813–831.
- 85) Gavin, C.E., Kates, B., Gerken, L.A., Rodier, P.M. (1994) Patterns of growth deficiency in rats exposed *in utero* to undernutrition, ethanol, or the neuroteratogen methylazoxymethanol (MAM). *Teratology*, 49:113–121.
- 86) Ohno, M., Aotani, H., Shimada, M. (1995) Glial responses to hypoxic/ischemic encephalopathy in neonatal rat cerebrum. *Develop. Brain Res.*, 84:294–298.
- 87) Jensen KF, Catalano SM. (1998) Brain morphogenesis and developmental neurotoxicology. Vt: *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, Slikker, Jr. W., Chang, L.W. (eds) Academic Press, New York, pp. 3–41.
- 88) Ikonomidou, C., Bosch, F., Miksa, M., Bittigau, P., Vöckler, J., Dikranian, K., Tenkova, T.I., Stefovská, V., Turski, L., Olney, J.W. (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science*, 283:70–74.

▼ M5

- 89) Ikonomidou, C., Bittigau, P., Ishimaru, M.J., Wozniak, D.F., Koch, C., Genz, K., Price, M.T., Sefovska, V., Hörster, F., Tenkova, T., Dikranian, K., Olney, J.W. (2000) Ethanol-induced apoptotic degeneration and fetal alcohol syndrome. *Science*, 287:1056–1060.
- 90) Friede, R. L. (1989) *Developmental Neuropathology*. Second edition. Springer-Verlag, Berlin.
- 91) House, D.E., Berman, E., Seeley, J.C., Simmons, J.E. (1992) Comparison of open and blind histopathologic evaluation of hepatic lesions. *Toxicol. Let.*, 63:127–133.
- 92) Tilson, H.A., MacPhail, R.C., Crofton, K.M. (1996) Setting exposure standards: a decision process. *Environ. Health Perspect.*, 104:401–405.
- 93) US EPA (2005) Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. US EPA NCEA-F-0644 A.
- 94) US EPA (1996) Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment, Federal Register 61(212): 56274-56322.
- 95) Danish Environmental Protection Agency (1995) *Neurotoxicology*. Review of Definitions, Methodology, and Criteria. Miljøprojekt nr. 282. Ladefoged, O., Lam, H.R., Østergaard, G., Nielsen, E., Arlien-Søborg, P.
- 96) Muller, K.E., Barton, C.N., Benignus, V.A. (1984). Recommendations for appropriate statistical practice in toxicologic experiments. *Neurotoxicology*, 5:113–126.
- 97) Gad, S.C. (1989) Principles of screening in toxicology with special emphasis on applications to Neurotoxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8:21–27.
- 98) Abby, H., Howard, E. (1973) Statistical procedures in developmental studies on a species with multiple offspring. *Dev. Psychobiol.*, 6:329–335.
- 99) Haseman, J.K., Hogan, M.D. (1975) Selection of the experimental unit in teratology studies. *Teratology*, 12:165–172.
- 100) Holson, R.R., Pearce, B. (1992) Principles and pitfalls in the analysis of prenatal treatment effects in multiparous species. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14: 221–228.
- 101) Nelson, C.J., Felton, R.P., Kimmel, C.A., Buelke-Sam, J., Adams, J. (1985) Collaborative Behavioral Teratology Study: Statistical approach. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, 7:587–90.
- 102) Crofton, K.M., Makris, S.L., Sette, W.F., Mendez, E., Raffaele, K.C. (2004) A qualitative retrospective analysis of positive control data in developmental neurotoxicity studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 26:345–352.
- 103) Bolon, B., Garman, R., Jensen, K., Krinke, G., Stuart, B., and an *ad hoc* working group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee. (2006) A ‘best practices’ approach to neuropathological assessment in developmental neurotoxicity testing — for today. *Toxicol. Pathol.* 34:296–313.
- 104) Tamura, R.N., Buelke-Sam, J. (1992) The use of repeated measures analysis in developmental toxicology studies. *Neurotoxicol. Teratol.*, 14(3):205–210.
- 105) Tukey, J.W., Ciminera, J.L., Heyse, J.F. (1985) Testing the statistical certainty of a response to increasing doses of a drug. *Biometrics*, 41:295–301.
- 106) Crofton, K.M., Foss, J.A., Haas, U., Jensen, K., Levin, E.D., and Parker, S.P. (2008) Undertaking positive control studies as part of developmental neurotoxicity testing: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):266–287.
- 107) Raffaele, K.C., Fisher, E., Hancock, S., Hazelden, K., and Sobrian, S.K. (2008) Determining normal variability in a developmental neurotoxicity test: report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):288–325.

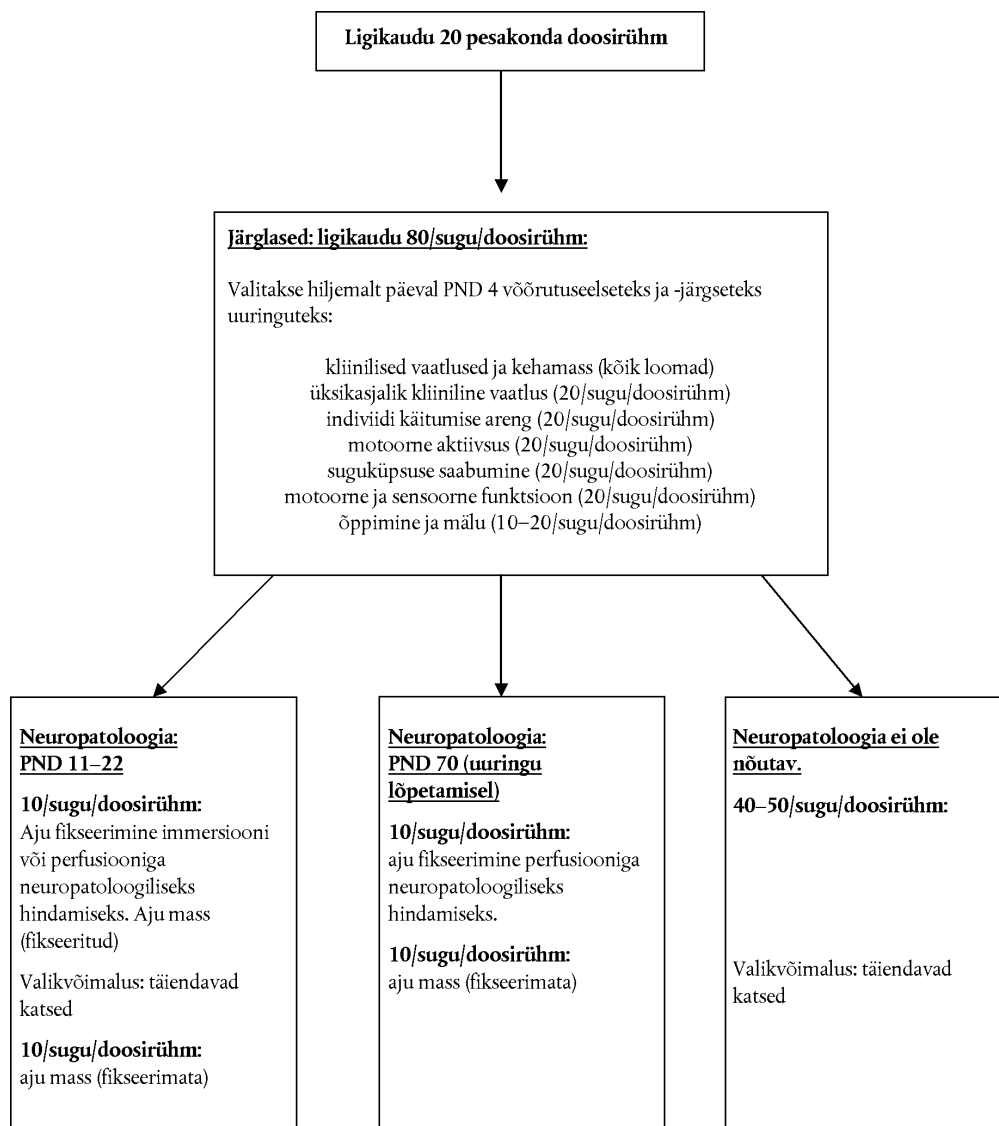
▼ M5

- 108) Holson, R.R., Freshwater, L., Maurissen, J.P.J., Moser, V.C., and Phang, W. (2008) Statistical issues and techniques appropriate for developmental neurotoxicity testing: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):326–348.
- 109) Tyl, R.W., Crofton, K.M., Moretto, A., Moser, V.C., Sheets, L.P., and Sobotka, T.J. (2008) Identification and interpretation of developmental neurotoxicity effects: a report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute expert working group on neurodevelopmental endpoints. *Neurotoxicology and Teratology*, 30(4):349–381.

▼ M5

Joonis 1

Üldine katseskeem funktsionaalsete ja käitumuslike katsete tegemiseks, neuropatoloogia hindamiseks ja ajumassi määramiseks. Diagramm põhineb punktides 13–15 esitatud kirjeldusel (PND — päev pärast sündi). Katsete jaoks loomade määramise näited on esitatud 1. liites



▼M5

1. liide

- Allpool esitatud tabelis on kirjeldatud näiteid, kuidas võib määrata loomi katsete tegemiseks. Näidete eesmärk on selgitada, et katseloomi võib katseteks määrata mitmel viisil, olenevalt katse korralduse põhimõttest.

1. näide

- Võõrutuseelseteks käitumise ontogeneesi katseteks kasutatakse üks komplekt poegi, mille koosseis on 20 looma kummagi soo ja iga doosimäära kohta (edaspidi „looma/sugu/doosimäär”) (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) humaanselt päeval PND 22. Aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse histopatoloogilise hindamise jaoks. Lisaks kogutakse ajumassi andmed, kasutades ülejäänud 10 isas- ja 10 emaslooma fikseerimata aju.
- Võõrutusjärgsete funktsionaalsete ja käitumuslike katsete (üksikasjalikud kliinilised vaatlused, motoorne aktiivsus, helisignaali harjumise ja kognitiivse funktsiooni katsed noorukieas) ning suguküpsuse saabumise vanuse hindamiseks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) anesteetatakse ja fikseeritakse perfusiooniga katse lõpetamisel (ligikaudu päeval PND 70). Pärast täiendavat fikseerimist *in situ* aju eemaldatakse ja töödeldakse neuropatoloogilise hindamise jaoks.
- Kognitiivsete funktsioonide testimiseks noorte täiskasvanute puhul (st PND 60–70) kasutatakse ära kolmas komplekt, mille koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) surmatakse uuringu lõpus, aju eemaldatakse ja kaalutakse.
- Ülejäänud 20 looma/sugu/doosimäär hoitakse varuks võimalike lisakatsete jaoks.

Tabel 1

Poeg nr ^(a)		Katseteks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
1	5	20 M + 20 N	Käitumise ontogenees
		10 M + 10 N	PND 22 aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria
		10 M + 10 N	PND 22 aju mass
2	6	20 M + 20 N	Üksikasjalikud kliinilised vaatlused
		20 M + 20 N	Motoorne aktiivsus
		20 M + 20 N	Suguküpsuse saabumine
		20 M + 20 N	Motoorne ja sensoorne funktsioon
		20 M + 20 N	Õppimine ja mälu (PND 25)
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria ~PND 70

▼ M5

Poeg nr ^(a)		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
3	7	20 M + 20 N	Õppimine ja mälu (noor täiskasvanu)
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass ~ PND 70
4	8	—	Reservloomad asendamiseks või lisakatseteks

^(a) Käesolevas näites vähendatakse pesakond 4 isas- ja 4 emasloomani; isased järglased saavad numbrid 1 kuni 4, emased — 5 kuni 8.

2. näide

- Võõrutuseelseteks käitumise ontogeneesi katseteks kasutatakse üks komplekt poegi, kelle koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär (1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) humaanselt päeval PND 11. Aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse histopatoloogilise hindamise jaoks.
- Teine komplekt loomi, kelle koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) kasutatakse võõrutusjärgseteks vaatlusteks (üksikasjalikud kliinilised vaatlused, motoorne aktiivsus, suguküpsuse saabumise vanuse ning motoorse ja sensoorse funktsiooni hindamine). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) anesteseeritakse ja fikseeritakse perfusiooniga katse lõpetamisel (ligikaudu päeval PND 70). Pärast täiendavat fikseerimist *in situ* aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse neuropatoloogilise hindamise jaoks.
- Noorukite ja noorte täiskasvanute kognitiivsete funktsioonide katsetamiseks kasutatakse 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Kognitiivsete funktsioonide katseteks päeval PND 23 ja noore täiskasvanu vanuses kasutatakse erinevaid loomi. Uuringu lõpetamisel surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär, kellega olid tehtud täiskasvanuea katseid, aju eemaldatakse ja kaalutakse.
- Ülejäänud 20 looma/sugu/doosimäär, keda ei valitud välja katseteks, surmatakse ja kõrvaldatakse võõrutamisel.

Tabel 2

Poeg nr ^(a)		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
1	5	20 M + 20 N	Käitumise ontogenees
		10 M + 10 N	PND 11 aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria
2	6	20 M + 20 N	Üksikasjalikud kliinilised vaatlused
		20 M + 20 N	Motoorne aktiivsus
		20 M + 20 N	Suguküpsuse saabumine
		20 M + 20 N	Motoorne ja sensoorne funktsioon
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria ~PND 70

▼ M5

Poeg nr ^(a)		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
3	7	10 M + 10 N ^(b)	Õppimine ja mälu (PND 23)
3	7	10 M + 10 N ^(b)	Õppimine ja mälu (noor täiskasvanu) Noore täiskasvanu aju mass
4	8	–	Päeval PND 21 surmatud ja kõrvaldatud loomad.

^(a) Käesolevas näites vähendatakse pesakond 4 isas- ja 4 emasloomani; isased järglased saavad numbrid 1 kuni 4, emased — 5 kuni 8.

^(b) Kognitiivseteks katseteks päeval PND 23 ja noore täiskasvanu eas kasutatakse erinevaid järglasi (nt paarisarvulised ja paarituarvulised pesakonnad kokku 20 pesakonnast).

3. näide

10. Päeval PND 11 kasutatakse aju massi ja neuropatoloogia hindamiseks üks komplekt poegi, kelle koosseis on 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest surmatakse 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) humaanselt päeval PND 11, nende aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse histopatoloogiliseks hindamiseks. Lisaks kogutakse ajumassi andmed, kasutades ülejäänud 10 isas- ja 10 emaslooma iga doosimäära kohta.
11. Käitumise ontogeneesi (motoorne aktiivsus) vaatlusteks ja võõrutusjärgseteks vaatlusteks (motoorne aktiivsus ja suguküpsuse saabumise vanuse hindamine) ning noorukite kognitiivsete funktsioonide katseteks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast).
12. Motoorse ja sensoorse funktsiooni katseteks (helisignaali harjumine) ja üksikasjalikeks kliinilisteks vaatlusteks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) anesteseeritakse ja fikseeritakse perfusiooniga katse lõpetamisel (ligikaudu päeval PND 70). Pärast täiendavat fikseerimist *in situ* aju eemaldatakse, kaalutakse ja töödeldakse neuropatoloogilise hindamise jaoks.
13. Noore täiskasvanukognitiivsete funktsioonide katseteks kasutatakse ära veel üks komplekt poegi 20 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast). Nendest loomadest 10 looma/sugu/doosimäär (st 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast) surmatakse uuringu lõpus, aju eemaldatakse ja kaalutakse.

Tabel 3

Poeg nr ^(a)		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
1	5	10 M + 10 N	PND 11 aju mass/neuropatoloogia/morfomeetria
		10 M + 10 N	PND 11 aju mass
2	6	20 M + 20 N	Käitumise ontogenees (motoorne aktiivsus)
		20 M + 20 N	Motoorne aktiivsus
		20 M + 20 N	Suguküpsuse saabumine
		20 M + 20 N	Õppimine ja mälu (PND 27)

▼ **M5**

Poeg nr ^(a)		Katseks määratud poegade arv	Vaatlus või katse
M	N		
3	7	20 M + 20 N	Helisignaal (noorukid ja noored täiskasvanud)
		20 M + 20 N	Üksikasjalikud kliinilised vaatlused
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass/ neuropatoloogia/morfomeetria ~PND 70
4	8	20 M + 20 N	Õppimine ja mälu (noor täiskasvanu)
		10 M + 10 N	Noore täiskasvanu aju mass

^(a) Käesolevas näites vähendatakse pesakond 4 isas- ja 4 emasloomani; isased järglased saavad numbrid 1 kuni 4, emased — 5 kuni 8.

▼ **M5**

2. liide

Mõisted

Kemikaal – aine või segu

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M5****B.54. UTEROTROOFNE BIOKATSE NÄRILISTEL: KIIRE SÕELKATSE ÖSTROGEENSETE OMADUSTE VÄLJASELGITAMISEKS**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 440 (2007). OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekreetsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid (1). Üks tegevussuund oli töötada välja näriliste uterotroofse biokatse juhend. Näriliste uterotroofne biokatse läbis seejärel ulatusliku valideerimisprogrammi; sealhulgas koostati üksikasjalik taustadokument (2, 3) ning tehti ulatuslikud laborisisesed ja laboritevahelised uuringud, et näidata biokatse asjakohasust ja reprodutseeritavust tugeva võrdlusöstrogeeni, nõrkade östrogeenireseptori agonistide, tugeva östrogeenireseptori antagonisti ja mõju mitteomava võrdluskemikaali puhul (4, 5, 6, 7, 8, 9). Käesoleva katsemetodi B.54 aluseks on kogemused, mis saadi valideerimiskatsete programiga, ja programmi käigus östrogeeniagonistidega saadud tulemused.

2. Uterotroofne biokatse on kiire sõelkatse, mis töötati välja 1930. aastatel (27, 28) ja mida esmakordselt standarditi sõelkatsena kasutamiseks 1962. aastal (32, 35). See põhineb emaka massi suurenemisel või nn uterotroofselt reaktsioonil (vt ülevaade 29). Sellega hinnatakse kemikaali võimet kutsuda esile bioloogilist mõju, mis sarnaneb looduslike östrogeenide (nt 17 β -östradioli) agonistide või antagonistide mõjuga, kuid meetodit kasutatakse hoopis sagedamini agonistide kui antagonistide leidmiseks. Emakas reageerib östrogeenidele kahel viisil. Esmane reaktsioon on massi suurenemine, mida põhjustab vee imamine. Sellele järgneb massi suurenemine kudede kasvu tulemusel (30). Hiire- ja rotiemaka reageerimine on kvalitatiivselt võrreldav.

3. Biokatset saab kasutada *in vivo* sõeluuringuks ja selle kasutamist tuleks vaadelda „Sisesekreetsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku” osana (2. liide). Selles kontseptuaalses raamistikus on uterotroofne biokatse 3. tasemel kui *in vivo* katse, mis annab andmeid üheainsa sisesekreetsioonimehhanismi, nimelt östrogeensuse kohta.

4. Uterotroofne biokatse on kavandatud osana *in vitro* ja *in vivo* katsetest, millega tehakse kindlaks endokriinsüsteemi mõjutada võivaid kemikaale, et hinnata ohtusid inimese tervisele ja keskkonnale. OECD valideerimisprogrammis kasutati nii tugevaid kui ka nõrku östrogeeni antagoniste, et hinnata katse kasutamist östrogeensete kemikaalide väljaselgitamiseks (4, 5, 6, 7, 8). Sellega tõendati meetodi tundlikkust östrogeeniagonistide suhtes ja lisaks ka head laborisisesest ja laboritevahelist korratavust.

5. Mis puutub mõjuta (n-õ negatiivsetesse) kemikaalidesse, siis valideerimisprogrammis kasutati vaid üht mõjuta võrdluskemikaali, mille kohta oli juba varem uterotroofse analüüsi ja ka *in vitro* retseptorisidumise ja retseptori katsetega tehtud kindlaks mõju puudumine, kuid on hinnatud veel OECD valideerimisprogrammist sõltumatuid täiendavaid andmeid, mis samuti toetavad uterotroofse biokatse selektiivsust östrogeeniagonistide kindlakstegemisel (16).

▼ M5

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

6. Östrogeeni agonistid ja antagonistid toimivad östrogeenireseptorite α ja β ligandidena ning võivad vastavalt aktiveerida või pidurdada retseptorite poolt kontrollitavat transkriptsiooni. See võib põhjustada tervisekahjustusi, sealhulgas reproduktiivfunktsiooni ja arengu häireid. Seepärast on vaja kiiresti hinnata kemikaale kui võimalikke östrogeeni agoniste või antagonistide. Kuigi ligandi afiinsus östrogeenireseptori suhtes või reportergeeni transkriptsiooni aktiveerimine *in vitro* annab küll olulist teavet, on see siiski vaid üks ohtu põhjustavatest võimalikest teguritest. Muud tegurid võivad hõlmata metabolismi kaudu aktiveerimist või inaktiveerimist pärast kehasse sisenemist, jaotumist sihtkudedes ja väljutamist kehast, mis vähemalt osaliselt sõltub ka manustamisteest ja uuritavast kemikaalidest. Seepärast on vaja kontrollida kemikaali võimalikku toimet *in vivo* asjakohastes tingimustes, kui kemikaali neeldumise, jaotumise, metabolismi ja väljutamisega seotud omadused juba ise ei paku vajalikku teavet. Emaka koed reageerivad östrogeenidega stimuleerimisele kiire kasvuga, eriti laboris peetavate näriliste puhul, kus östraaltsükkel kestab umbes 4 päeva. Närilisi, eriti rotte, kasutatakse laialdaselt ka mürgisuse uuringutes ohu iseloomustamiseks. Seepärast on närilise emakas sobiv sihtorgan, millega saab teha *in vivo* sõeluringuid östrogeeni agonistide ja antagonistide väljaselgitamiseks.

7. Käesolev katsemeetod põhineb OECD valideerimisuuringus kasutatud katse-eeskirjadel, mis osutusid usaldusväärseks ja korratavaks nii laborisestest kui ka laboritevahelistes uuringutes (5, 7). Praegu on kättesaadavad kaks meetodit, nimelt eemaldatud munasarjadega täiskasvanud emaslooma meetod (*OVX-adult method*) ja eemaldamata munasarjadega ebaküpse emase meetod (*immature method*). OECD valideerimiskatsete programmiga näidati, et nende meetodite tundlikkus ja reprodutseeritavus on võrreldavad. Meetod, milles kasutatakse ebaküpset emaslooma, kelle hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS) telg on kahjustamata, on siiski mõnevõrra vähem spetsiifiline, kuid selle meetodiga saab uurida laiemat mõjude spektrit kui eemaldatud munasarjadega emaslooma meetodiga, kuna see näitab ka kemikaalide mõju HAS-teljele, mitte üksnes östrogeenireseptorile. Roti HAS-telg hakkab toimima umbes 15. elupäevast. Enne nimetatud tähtaega ei saa gonadoliberiiniga (GnRH) puberteeti kiirendada. Kui emasloomad hakkavad jõudma puberteediikka, siis enne tupe avanemist on neil mitu n-ö vaikset tsüklit, millega ei kaasne tupe avanemist või ovulatsiooni, kuid kaasnevad teatavad hormoonitaseme kõikumised. Kui kemikaal otse või kaudselt stimuleerib HAS-telge, on tulemuseks enneaegne puberteet, varane ovulatsioon ja tupe varasem avanemine. Seda võivad põhjustada mitte ainult HAS-teljele toimivad kemikaalid, vaid ka mõned tavalisest suurema metaboliseeritava energia sisaldusega dieetid, mis stimuleerivad kasvu ja kiirendavad tupe avanemist, kuigi ei ole östrogeensed. Sellised kemikaalid ei tekita uterotroofset reaktsiooni täiskasvanud OVX-loomal, kuna tema HAS-telg ei tööta.

8. Loomade heaolu huvides tuleks eelistada ebaküpsete rottide meetodit, millega välditakse loomade kirurgilist eeltöötlemist ja ka selliste loomade võimalikku kasutamata jätmist, kellel esineb östruse alguse märke (vt punkt 30).

▼ M5

9. Uterotroofne reaktsioon ei ole täielikult tingitud östrogeenidest, st seda võivad esile kutsuda ka kemikaalid, mis ei ole östrogeenide agonistid või antagonistid. Näiteks suhteliselt suured progesterooni, testosterooni või mitmesuguste sünteetiliste kollaskehahormoonide doosid võivad kõik põhjustada seda reaktsiooni (30). Igasugust reaktsiooni tuleb uurida histoloogiliselt tupe keratinisatsiooni ja sarvestumise suhtes (30). Olenemata reaktsiooni võimalikust põhjusest tuleks uterotroofse biokatse positiivse tulemuse puhul algatada täiendav uuring selguse saamiseks. Täiendavaid tõendeid östrogeensuse kohta võib saada *in vitro* katsetega, nagu östrogeenireseptori sidumise katse ja transkriptsiooni aktivatsiooni katse või muud *in vivo* uuringud, näiteks emasloomade puberteedi katse.
10. Kui võtta arvesse, et uterotroofne biokatse on ette nähtud *in vivo* sõeluuringuks, on kontrollimisviisi valikul lähtunud nii loomade heaoluga seotud kaalutlustest kui ka korrastatud astmelise katsetamise strateegiast. Sel eesmärgil püüti hoolikalt kontrollida, kuivõrd korratavalt ja tundlikult lubab meetod kindlaks teha östrogeensust, mis on paljude kemikaalide puhul peamine mure; vähem pöörati tähelepanu katsega antiöstrogeensuse tõendamise küljele. Katsetati ainult ühte tugevat antiöstrogeeni, kuna selgelt teadaolevate antiöstrogeensete kemikaalide (millel ei ole mingit varjavat östrogeenset mõju) on väga piiratud. Käesolevas katsemeetodis käsitletakse seega östrogeensete omaduste tuvastamist; antagonistliku toime tuvastamist on käsitletud ühes juhenddokumendis (37). Biokatse korratavus ja tundlikkus puhtalt antiöstrogeense toimega kemikaalide puhul määratletakse täpsemalt hiljem, kui katset on tavameetodina mõnda aega kasutatud ja leitud rohkem sellise toimeviisiga kemikaale.
11. Meetodi kasutamisel arvestatakse, et kõik katsed loomadega peavad vastama loomakaitse kohalikele normidele; järgmised loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele, ning kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (38), on nende suhtes ülimuslikud. OECD on esitanud loomade humaanse kohtlemise täiendavad juhendid (25).
12. Nagu elusloomadega tehtavate katsete puhul tavaliselt, on enne katse algust oluline tagada, et andmed on tõepoolest vajalikud. Andmed võivad olla tõeliselt vajalikud näiteks järgmiste kahe olukorra puhul:
- suur oht kokkupuuteks (kontseptuaalne raamistik, 1. tase, vt 2. liide) või kaudsed andmed kemikaali östrogeensuse kohta (2. tase), mille tõttu on vaja uurida, kas selline mõju võib esineda *in vivo*;
 - toimed, mis näitavad östrogeensust 4. või 5. tasemel *in vivo* katsetes ja millest selgub, et mõjud on seotud östrogeense mehhanismiga, mida ei saa uurida *in vitro* katses.
13. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

▼ **M5****KATSE PÕHIMÕTE**

14. Uterotroofse biokatse tundlikkuse aluseks on loomkatsesüsteem, milles hüpotalamuse-ajuripatsi-munasarjade telg ei funktsioneer, mistõttu vereringes on vähe endogeenset östrogeeni. See tagab emaka väikse massi mõjutaja puudumisel (nn nulljoon) ja maksimaalse reageerimise manustatud östrogeenidele. Näriliste emasloomadel esineb sellist östrogeenitundlikku seisundit kahes olukorras:
- i) ebaküpsed emasloomad pärast võõrutamist ja enne puberteeti, ning
 - ii) noored täiskasvanud emasloomad pärast munasarjade eemaldamist, kui on antud piisavalt aega emaka taandarenguks.
15. Uuritavat kemikaali manustatakse iga päev suukaudselt sondiga või naha alla tehtava süstiga. Uuritava kemikaali eri doose manustatakse vähemalt kahele katseloomade doosirühmale (vt punkt 33), kasutades kummaski rühmas oma doositaset ja manustamist kolmel järjestikusel päeval ebaküpsete emasloomade meetodi puhul ja vähemalt kolmel järjestikusel päeval täiskasvanud OVX-emasloomade meetodi puhul. Loomad lahatakse 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Östrogeeni agonistide leidmiseks hinnatakse kemikaali saanud loomade keskmist emaka massi ja võrreldakse kandeainet saanud loomade rühma vastava näitajaga, et leida statistiliselt olulist suurenemist. Emaka keskmise massi statistiliselt oluline suurenemine osutab, et kõnealuse biokatse vastus on positiivne.

MEETODI KIRJELDUS**Loomaliigi valimine**

16. Katseloomadena võib kasutada tavaliselt laboris peetavate näriliseliniide loomi. Valideerimiseks kasutati näiteks Wistari ja Sprague-Dawley liini rotte. Ei tohiks kasutada selliste liinide emasloomi, kelle emakas on või arvatakse olevat vähem tundlik. Labor peaks tõendama liini tundlikkust, nagu on kirjeldatud punktides 26 ja 27.
17. Uterotroofseks biokatseks on juba alates 1930. aastatest tavaliselt kasutatud rotte ja hiiri. OECD valideerimisuuringud tehti ainult rottidega, lähtudes arusaamast, et neid liike võib pidada samaväärseks ja seepärast piisab ülemaailmseks valideerimiseks katsetest ühe liigi loomadega, kuna sellega säästetakse vahendeid ja loomi. Rott valitakse katseloomaks enamiku reproduktiiv- ja arenguhäireid põhjustava toksilisuse uuringutes. Arvestades seda, et hiirte kohta on olemas ulatuslik varasema kasutuse andmebaas, ja selleks, et laiendada näriliste uterotroofse biokatse kasutamist ka hiirtele kui katseliigile, tehti piiratud valideerimisuuring hiljem ka hiirtele (16). Kuna peamine soov oli hoida kokku vahendeid ja loomi, valiti võrdlusmeetod, milles kasutati piiratud arvu uuritavaid kemikaale ja osalevaid laboreid ning ei kasutatud koodiga tähistatud näidiste katsetamist. Kõnealune uterotroofse biokatse võrdlev valideerimisuuring näitab, et noorte täiskasvanud OVX-hiirte puhul on rottide ja hiirtega saadud andmed omavahel kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt heas kooskõlas. Kui uterotroofse biokatse tulemus on pikema uuringu eelkatse, võimaldab selline kooskõla kasutada mõlemas uuringus sama liini samast allikast pärinevaid loomi. Võrdleva lähenemise viisi juures piirduti OVX-hiirte kasutamisega ja katsed ei andnud töökindlaid andmeid, mis oleksid võimaldanud valideerida meetodi ka ebaküpsete emasloomade mudeli jaoks, seepärast ebaküpsete hiirte mudelit käesoleva katsemeetodi raames ei vaadelda.

▼ M5

18. Seega võib mõnel juhul rottide asemel kasutada hiiri. Hiirte kasutamist tuleks põhjendada, lähtudes toksikoloogilistest, farmakokineetilistest ja/või muudest kriteeriumidest. Hiirte korral võib olla vaja muuta katse-eeskirja. Näiteks kasutavad hiired oma kehamassi kohta rohkem sööta ja seepärast peab sööda fütoöstrogeenisaldus olema hiirte puhul madalam kui rottide puhul (9, 20, 22).

Pidamis- ja söötmingimused

19. Kogu katse teostus peaks vastama laboriloomade hooldamise kohalikele normidele. Siin esitatud loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele, ning kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (38), on nende suhtes üliluslikud. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (ligikaudne vahemik ± 3 °C). Suhteline õhuniiskus peaks olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal. Eesmärgiks peaks olema suhtelise õhuniiskuse hoidmine 50–60 % vahemikus. Valgustus peaks olema kunstlik. Ööpäevas peaks olema 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.
20. Laborisööda ja joogivee tarbimine peaks olema *ad libitum*. Noori täiskasvanud loomi võib hoida puurides eraldi või kuni kolmest loomast koosneva rühmana. Ebaküpsete loomade nooruse tõttu soovitatakse neid pidada puurides sotsiaalsete rühmadena.
21. On teada, et fütoöstrogeenide suur sisaldus laborisöödas suurendab näriliste emaka massi sedavõrd, et see segab uterotroofse biokatse tegemist (13, 14, 15). Fütoöstrogeenide ja metaboliseeritava energia kõrge tase kasutatavas söödas võib ebaküpsete loomade korral põhjustada ka varast puberteeti. Laborisöödas on fütoöstrogeene peamiselt siis, kui söödaks kasutatakse soja- ja lutsernitooteid, ning on näidatud, et fütoöstrogeenide tase võib sõltuda standardse laborisööda partiist (23). Kehamass on oluline muutuja, kuna tarbitav sööda kogus on seotud kehamassiga. Seetõttu võib tegelik saadav fütoöstrogeenide doos sama sööda juures sõltuda loomaliigist ja vanusest (9). Ebaküpsete emasrottide puhul võib sööda tarbimine kehamassi kohta olla ligikaudu kaks korda suurem kui eemaldatud munasarjadega noorte täiskasvanud emasloomade puhul. Noorte täiskasvanud hiirte puhul võib sööda tarbimine kehamassi kohta olla ligikaudu neli korda suurem kui eemaldatud munasarjadega noorte täiskasvanud emasrottide puhul.
22. Uterotroofse biokatse tulemused (9, 17, 18, 19) näitavad siiski, et piiratud koguse fütoöstrogeenide olemasolu söödas on lubatav ja ei vähenda biokatse tundlikkust. Juhinduda tuleks sellest, et söödaga saadav fütoöstrogeenide kogus ei ületaks 350 µg genisteiiniekvivalenti laborisööda grammi kohta ebaküpsete Sprague-Dawley ja Wistari rottide puhul (6, 9). Selline sööt peaks samuti sobima katse tegemisel noorte täiskasvanud OVX-rottidega, kuna nende söödatarbimine kehamassi kohta on väiksem kui ebaküpsel loomadel. Kui kasutatakse täiskasvanud OVX-hiiri või fütoöstrogeenide suhtes tundlikumaid rotte, tuleb sööda fütoöstrogeenisaldust vastavalt vähendada (20). Lisaks võivad eri söötade kättesaadava metaboliseeritava energia erinevused põhjustada puberteedi algust eri vanuses (21, 22).

▼M5

23. Enne uuringut tuleb hoolikalt valida sööt, mille fütoöstrogeenide tase ei oleks liiga kõrge (vt juhendid 6, 9) või milles ei oleks liiga palju metabooliseeritavat energiat, mis võib moonutada tulemusi (15, 17, 19, 22, 36). Laboris kasutatava katsesüsteemi õige toimimise tagamine, nagu on täpsustatud punktides 26 ja 27, on oluline mõlema teguri kontrolli alla võtmiseks. Hea laboritava kohane kaitsemeede on võtta uuringu ajal manustatava sööda igast partiist representatiivsed proovid, et oleks võimalik teha fütoöstrogeenisalduse analüüse (nt kui kontrollrühma keskmine emaka mass on suurem kui varasemate kontrollrühmade puhul või kui katsest standardöstrogeeni 17 α -etinüülöstradiooliga saadakse ebasobiv tulemus). Uuringu käigus tuleks teha alikvootide analüüs või need külmutada –20 °C juures või säilitada nii, et proovid ei laguneks enne analüüsimist.
24. Mõned allapanumaterjalid võivad sisaldada looduslikult esinevaid östrogeenseid või antiöstrogeenseid kemikaale (nt on teada, et maisitõlvik mõjutab emasrottide tsükli ja näib olevat antiöstrogeenne). Valitud allapanumaterjal peaks sisaldama võimalikult vähe fütoöstrogeene.

Loomade ettevalmistamine

25. Katseks valitakse loomad, kel ei esine mingeid haigusnähte ega füüsilisi kõrvalekaldeid, ja need jagatakse juhuvaliku alusel kontroll- ja doosirühmadesse. Puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Loomadele tuleks anda kordumatu märgis. Ebaküpsed loomad peaksid eelistatavalt olema kuni võõrutamiseni puurides koos oma ema või kasuemaga. Kohanemisaeg enne uuringu algust peaks olema umbes 5 päeva noorte täiskasvanud loomade puhul ja ebaküpsede loomade puhul, kes on tarnitud koos oma ema või kasuemaga. Kui ebaküpsed loomad ostetakse ilma emata kohe pärast võõrutamist, võib olla vajalik kasutada lühemat kohanemisaega, kuna dooside manustamine peaks algama kohe pärast võõrutamist (vt punkt 29).

KATSE KORRALDUS**Labori pädevuse kontrollimine**

26. Labori pädevuse kontrollimiseks saab kasutada kahte meetodit:
- perioodiline kontrollimine, mille aluseks on algse nulljoone positiivse kontrolli katse (vt punkt 27). Vähemalt iga 6 kuu järel ja iga kord, kui toimub muutus, mis võib mõjutada katse usaldusväärsust (nt uus laborisööda koostis, uus lahkamist teostav isik, loomaliini või loomade tarnija vahetamine jne) tuleks kontrollida katsesüsteemi (loommudeli) tundlikkust, kasutades nulljoone positiivse kontrolli katset, mida on kirjeldatud punktis 27 ja võrdlusöstrogeeni 17 α -etinüülöstradiooli (CASI nr 57-63-6) (EE) sobivat doosi;
 - samaaegsete kontrollkatsete tegemine, milleks nähakse igas katses ette rühm, kellele manustatakse sobiv doos võrdlusöstrogeeni.

Kui süsteemi reaktsioon ei vasta ootustele, tuleb uurida katsetingimusi ja neid vastavalt muuta. On soovitatav, et kummagi lähenemisviisi puhul kasutata võrdlusöstrogeeni doos oleks ligikaudu 70–80 efektiivdoosi.

▼M5

27. **Nulljoone positiivse kontrolli katse.** Enne kui labor teeb käesoleva katsejuhendi järgi esimese katse, tuleks tal tõendada oma pädevust. Selleks uuritakse loomumudeli reageerimist võrdlusöstrogeeni 17 α -etüüülöstradiooli (CASi nr 57-63-6) (EE) vähemalt neljale doosile. Emaka massi suurenemist võrreldakse varasemate kontrollitud andmetega (vt viide 5). Kui kõnealune nulljoone positiivse kontrolli katse ei anna oodatud tulemusi, tuleb katsetingimused üle vaadata ja neid muuta.

Loomade arv ja seisund

28. Igas doosi- ja kontrollrühmas peaks olema vähemalt 6 looma (nii ebaküpse emaslooma kui ka täiskasvanud OVX-emaslooma eeskirja puhul).

Ebaküpsete loomade vanus

29. Ebaküpsete loomade uterootroofse biokatse tegemisel peab olema täpsustatud loomade sünni kuupäev. Dooside manustamisega tuleks alustada piisavalt vara, et uuritava kemikaali manustamise lõpuks ei oleks puberteediga seotud endogeensete östrogeenide taseme tõus veel alanud. Teisest küljest on tõendeid, et väga noored loomad võivad olla vähem tundlikud. Optimaalse vanuse kindlaksmääramiseks peaks iga labor võtma arvesse oma varasemaid tulemusi suguküpsuse saavutamise kohta.

Üldise suunisenähtena võib rottidele dooside manustamist alustada kohe pärast varast võõrutamist, st 18. päeval pärast sündi (sünnimise päev loetakse sünnijärgseks päevaks 0). Dooside manustamine rottidele tuleks eelistatult lõpetada 21. sünnijärgsel päeval ja igal juhul enne 25. sünnijärgset päeva, kuna pärast seda päeva hakkab hüpotalamuse-ajuripatsi-munasarjade telg toimima ja endogeensete östrogeenide tase võib hakata tõusma, millele vastavalt hakkab suureneva keskmise nulljoone emaka mass ja rühma standardhälve (2, 3, 10, 11, 12).

Munasarjade eemaldamise kord

30. Eemaldatud munasarjadega rottide ja hiirte saamiseks (doosi- ja kontrollrühmad) tuleb emasloomal eemaldada munasarjad vanuses 6–8 nädalat. Roti puhul peab munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel olema vähemalt 14 päeva, et emakas saaks taandareneda miinimumini ehk stabiilse nulljooneni. Hiire puhul peab munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel olema vähemalt 7 päeva. Kuna östrogeenide taseme tõstmiseks veres piisab juba väiksest kogusest munasarjakoest (3), tuleks loomi enne kasutamist kontrollida tupe-tampooniprooviga saadud epiteelirakkude vaatlemisega vähemalt viiel järjestikusel päeval (nt päevad 10–14 pärast roti emaslooma munasarjade eemaldamist). Kui loomal esineb algava östruse tunnuseid, ei tohiks teda katseks kasutada. Lisaks tuleb lahingul uurida munasarjade kunagisi kinnituskohati munasarjakoe leidmiseks. Kui sellist kude leitakse, et tohiks looma andmeid arvutustes kasutada (3).
31. Munasarjade eemaldamiseks loom tuimestatakse korralikult ja pannakse lamama kõhuli. Sisselõige, millega avatakse kõhuõõne dorsolateraalne sein, peaks olema pikkusega umbes 1 cm ja asuma alumise roidekaare ja niudeluuharja vahelise ala keskel ning mõni millimeeter külgmiselt niudelihase välimisest servast. Munasari tuleks eemaldada kõhuõõnest aseptilisele alale. Munasari tuleks eraldada munajuha ja emakakeha kokkupuutekohalt. Kui on tehtud kindlaks, et massiivset verejooksu ei ole, tuleks kõhuõõne sein sulgeda õmblusega ja nahahaav sulgeda klambrite või sobiva õmblusega. Niidiga sidumise kohad on skemaatiliselt näidatud joonisel 1. Tuleb kasutada asjakohast operatsioonijärgset tuimestust, vastavalt näriliste ravis kogenud veterinaararsti soovitudele.

▼ **M5****Kehamass**

32. Täiskasvanud OVX-emaslooma meetodi kasutamisel ei ole kehamass ja emaka mass omavahel seotud, kuna emaka massi mõjutavad hormoonid, nagu östrogeenid, kuid mitte kasvutegurid, mis reguleerivad keha suurust. Seevastu ebaküpse emaslooma kasutamisel on kehamass seotud emaka massiga küpsemise ajal (34). Uuringu alguses peaks loomade kehamassi erinevus olema minimaalne ega tohiks ebaküpse emaslooma meetodi kasutamisel ületada ± 20 % keskmisest kehamassist. See tähendab, et loomade kasvataja peaks standardima pesakonna suuruse, et eri emasloomade järglased saaksid umbes ühepalju toitu. Loomad tuleks jaotada (kontroll- ja doosi)rühmadesse kehamassi varieeruvuse järgi juhuvaliku alusel, nii et iga rühma keskmine kehamass ei oleks statistiliselt erinev muu rühma vastavast näitajast. Tuleks jälgida, et sama pesakonna liikmeid ei määrataks samasse doosirühma, kuivõrd see on võimalik ilma uuringus kasutatavate pesakondade arvu suurendamiseta.

Doseerimine

33. Selleks et teha kindlaks, kas uuritava kemikaalil võib *in vivo* olla östrogeenset toimet, piisab tavaliselt kahest doosirühmast ja ühest kontrollrühmast; seepärast eelistatakse sellist katse kava loomade heaoluga seotud põhjustel. Kui eesmärk on saada doosi ja toime vahelise sõltuvuse kõver või ekstrapoleerida toimet madalamatele doosidele, on vaja vähemalt 3 doosirühma. Kui on vaja ka muud teavet peale östrogeense toime kindlakstegemise (näiteks hinnata mõju tugevust), tuleks kaaluda teistsugust dooside manustamise režiimi. Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui katserühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui uuritava aine manustamisel kasutatakse kandeainet, peaks kontrollrühm saama doosirühmadega võrdses koguses kandeainet (või kui doosirühmades kasutatakse erinevaid koguseid, siis neist suurima koguse).
34. Uterotroofse biokatse puhul on eesmärk valida doosid, mis tagaksid loomade ellujäämise ning mis ei oleks oluliselt mürgised ega põhjustaks loomadele erilist stressi pärast uuritava kemikaali manustamist kolmel järjestikusel päeval maksimumdoosiga kuni 1 000 mg/kg/päevas. Kõikide doosimäärade valimisel tuleks arvesse võtta kõiki uuritava kemikaali või sellega seotud materjalide toksilisust käsitlevaid ja (toksiko-)kineetilisi andmeid. Kõrgeima doosimäära puhul tuleks kõigepealt arvestada LD50 väärtust ja/või andmeid ägeda mürgisuse kohta, et vältida loomade surma, suuri kannatusi ja stressi (24, 25, 26). Suurim doos peaks vastama suurimale talutavale doosile; uuringu võib teha ka doosi suuruse juures, mis põhjustab positiivse uterotroofse reaktsiooni. Kuna see on sõelkatse, siis võib üldiselt kasutada suuri dooside intervalle (näiteks 0,5 logaritmilist ühikut, mis vastab dooside 3,2-kordsele erinevusele, või isegi kuni 1 logaritmiline ühik). Kui vajalikke andmeid ei ole, võib kasutatavate dooside leidmise hõlbustamiseks teha doosipiirkonna määramise katse.
35. Teiselt poolt, kui agonisti östrogeenseid omadusi on võimalik hinnata *in vitro* (või *in silico*) andmetest, võib neid doosi valimisel arvesse võtta. Näiteks määratakse uuritava kemikaali kogus, mis uterotroofses biokatses põhjustab võrdlusagonisti (etinüülöstradiool) mõjuga ekvivalentse reaktsiooni, tema suhtelise tõhususe järgi *in vitro*, võrreldes etinüülöstradiooliga. Kõrgeim katses kasutatav doos leitakse selle ekvivalentse doosi korrutamisel sobiva teguriga, näiteks 10 või 100ga.

▼ **M5****Vahemiku leidmise kaalutlused**

36. Vajaduse korral võib väikse arvu loomadega teha esialgse uuringu doosi-vahemiku leidmiseks. Selleks võib kasutada OECD juhenddokumenti nr 19 (25), milles on määratletud mürgisusele või looma stressile osutavad kliinilised tunnused. Kui see on doosivahemiku leidmise uuringus teostatav, võib emakad pärast kolmepäevast kemikaali manustamist välja lõigata ja kaaluda ligikaudu 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Neid andmeid võiks seejärel kasutada põhiuuringu kava koostamiseks (et valida sobivad suurim ja väiksem doos ja vajalik doosirühmade arv).

Dooside manustamine

37. Uuritavat kemikaali manustatakse suukaudselt sondiga või naha alla tehtava süstiga. Manustamistee valimisel tuleb arvestada loomade heaolu kaalutlusi, toksikoloogia aspekte (kuivõrd asjakohane on teatav manustamistee, arvestades inimese kemikaaliga kokkupuute viise (nt suukaudne sond vastab allaneelamisele, nahaalused süstid sissehingamisele või naha kaudu imendumisele), uuritava materjali füüsikalisi ja keemilisi omadusi ning eriti olemasolevaid toksikoloogilisi andmeid ning andmeid metabolismi ja kineetika kohta (nt vajadus vältida presüsteemset metabolismi, suurem tõhusus teatava manustamistee korral).
38. Soovitav on võimaluse korral kõigepealt kaaluda manustamist vesilahusena või suspensioonina vees. Kuid kuna enamik östrogeenseid ligande või nende metaboolseid eellasi on hüdrofoobsed, kasutatakse kõige sagedamini lahust või suspensiooni õlis (nt maisi-, maapähkli-, seesami- või oliiviõli). Need õlid on eri kalorsuse ja rasvasisaldusega, seega võib kandeaine mõjutada üldist metaboliseeritava energia omastamist, mille tõttu võivad muutuda mõõdetavad näitajad, nagu emaka mass, eeskätt ebaküpse emaslooma meetodi puhul (33). Seepärast tuleb enne uuringut katsetada kandeainet ja võrrelda kontrollrühmaga, kellele ei anta kandeainet. Uuritava kemikaali võib lahustada minimaalses koguses 95 % etanoolis või muus sobivas lahustis ja lahjendada lõpliku töökonsentratsioonini katses kasutatavas kandeaines. Lahusti toksilised omadused peavad olema teada ning need tuleks välja selgitada eraldi kontrollrühmaga, kellele manustatakse üksnes lahustit. Kui uuritavat kemikaali peetakse stabiilseks, võib selle lahustamise hõlbustamiseks kasutada ettevaatlikku soojendamist ja tugevat segamist. Tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines. Kui uuritav kemikaal on stabiilne kogu uuringu jooksul, võib valmistada uuritava kemikaali lähtealivoodi ja teha sellest iga päev vajalikud lahjendused.
39. Doosi manustamise ajastus sõltub kasutatavast mudelist (vt punkt 29, ebaküpse emaslooma mudel, ja punkt 30, täiskasvanud OVX-emaslooma mudel). Ebaküpsetele emasrottidele manustatakse uuritavat kemikaali iga päev kolmel järjestikusel päeval. Kolmepäevast dooside manustamist soovitatakse ka täiskasvanud OVX-emasrottide puhul, kuid sel juhul on lubatav ka pikem kokkupuude ja nii saab paremini avastada nõrga toimega kemikaale. Täiskasvanud OVX-emashiirte puhul peaks 3-päevane manustamine olema piisav ja manustamise pikendamisel seitsme päevani ei ole tugevate östrogeeniagonistide puhul erilisi eeliseid, kuid valideerimisuuringus näidati, et nõrkade agonistidega see nii ei ole (16), seepärast tuleks OVX-emashiirte puhul pikendada dooside manustamist kuni 7 järjestikuse päevani. Doos tuleks manustada iga päev samal kellaajal. Doose tuleks vajaduse korral kohandada, et säilitada konstantset doosimäära looma kehamassi suhtes (nt mg uuritavat kemikaali ühe kg kehamassi kohta päevas). Katses kasutatava lahuse mahu muutumine tuleks hoida minimaalne; tuleks muuta uuritava aine lahuse kontsentratsiooni, et tagada ühesugune lahuse maht kehamassi suhtes kõikide dooside ja manustamisviiside puhul.

▼ **M5**

40. Kui uuritavat kemikaali manustatakse loomadele sundsöötmisega, tuleks seda teha ühe doosi kaupa, kasutades maosondi või sobivat intubatsiooni-kanüüli. Suurim vedeliku maht, mida saab ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Tuleb järgida kohalikke loomakaitse eeskirju, kuid lahuse maht ei tohiks ületada 5 ml kehamassi kg kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, mida võib manustada kuni 10 ml kehamassi kg kohta.
41. Kui uuritavat kemikaali manustatakse nahaaluse süstiga, tuleks päevane doos manustada üheainsa süstiga. Doose tuleks manustada selja abaluu- või nimmepiirkonda steriilse nõela (kaliiber näiteks 23 või 25) ja tuberkuliinisüstlaga. Soovi korral võib süstimiskoha puhtaks raseerida. Registreerida tuleks lahuse kaod, süstekohast väljaimbumine või doosi mittetäielik manustamine. Rotile päevas süstitav lahuse maht ei tohiks ületada 5 ml kehamassi kg kohta, mis jagatakse kahe süstekoha vahel; vesilahuste puhul võib erandina süstida 10 ml kehamassi kg kohta.

Vaatlused*Üld- ja kliinilised vaatlused*

42. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas ja sagedamini, kui ilmneb toksilisuse märke. Vaatlusi oleks soovitatav teha iga päev samal ajal, võttes arvesse oodatava maksimaalse mõju avaldumise aega pärast doosi manustamist. Kõigi loomade puhul jälgitakse suremust, haigestumust ja selliseid kliinilisi tunnuseid nagu käitumise, naha, karvkatte, silmade ja limaskestade muutused, eritiste esinemine, autonoomse närvisüsteemi aktiivsuse muutused (nt pisaravool, turris karv, pupilli suurus, muutunud hingamine).

Kehamass ja sööda tarbimine

43. Kõiki loomi tuleks kaaluda iga päev täpsusega 0,1 g, alustades hetkest enne esimese doosi manustamist, st kui loomad on juba jagatud rühmadesse. Lisaks võib mõõta dooside manustamise aja jooksul igas puuris tarbitud sööda koguse söötmissaadmete kaalumiseega. Sööda tarbimise tulemused väljendatakse grammides ühe roti kohta päevas.

Lahkamine ja emaka massi mõõtmine

44. Kaksikümend neli tundi pärast viimase doosi manustamist rotid surmatakse humaanselt. Ideaaljuhul tuleks kõikide rühmade liikmete lahkamised teha juhuslikus järjekorras, et vältida kõige alguses või kõige lõpus ühe või teise rühma liikmete lahkamist, mis võiks andmeid natuke mõjutada. Biokatse eesmärk on mõõta nii märja emaka kui ka kuivatatud emaka mass. Märjmass hõlmab emaka ja selle valendikus oleva vedeliku massi. Kuivatatud emaka mass mõõdetakse pärast selle valendikus oleva vedeliku väljapigistamist ja kõrvaldamist.
45. Ebaküpsete emasloomade puhul uuritakse enne lahkamist tuppe, et teha kindlaks tupe võimalik avanemine. Lahkamist alustatakse kõhuseina avamisega alates häbemeliidusest. Seejärel eemaldatakse emakasarved ja munasarjad, kui viimased on olemas, kõhuõõne dorsaalse seina küljest. Emaka ja tupe ventraalselt ja lateraalselt küljelt eemaldatakse kusepõis ja kusejuhad. Kiulised ühendused päraku ja tupe vahel eraldatakse, kuni võib näha tupe-suudme ja lahkliha naha ühenduskohta. Emakas ja tupp eraldatakse kehast tupeseina läbilõikamisega otse lahklihanahaga ühenduse kohalt, nagu on näidatud joonisel 2. Emakas tuleks kõhuseinast eraldada emaka kinnisti (mesenteeriumi) ettevaatliku läbilõikamisega selle kinnituskohalt kummagi

▼ **M5**

emakasarve dorsolateraalse külje kogu pikkuses. Pärast kehast eemaldamist tuleks emakat käsitseda piisavalt kiiresti, et vältida kudede kuivamist. Massikadu kuivamise tõttu muutub olulisemaks just väikeste kudede nagu emaka puhul (23). Kui munasarjad on alles, eemaldatakse need munajuha juurest, vältides valendikus oleva vee väljavoolamist emakasarvest. Kui loomal on munasarjad eemaldatud, tuleks munasarjade kunagisi kinnituskohhti uurida munasarjakoe leidmiseks. Liigne rasv ja sidekude tuleks ära lõigata. Tupp eraldatakse emakast veidi allpool emakakaela, nii et emakakael jääb emakakeha juurde, nagu on näidatud joonisel 2.

46. Iga emakas tuleks paigutada kordumatu märgisega teadaoleva massiga anumasse (nt Petri tass või plastikust kaalumiskoost, jälgides kogu aeg, et koed ei enne kaalumist ära ei kuivaks (nõusse võib panna näiteks soolalahusega kergelt niisutatud filterpaberi). Emakas koos valendikus oleva vedelikuga kaalutakse täpsusega 0,1 mg (märja emaka mass).
47. Seejärel töödeldakse eraldi iga emakat, et eemaldada valendikus olev vedelik. Mõlemad emakasarved torgatakse läbi või lõigatakse pikuti lõhki. Emakas pannakse kergelt niisutatud filterpaberile (nt Whatman nr 3) ja pressitakse kergelt teise kergelt niisutatud filterpaberiga valendikus oleva vedeliku täielikuks eemaldamiseks. Emakas ilma valendikus oleva vedelikuta kaalutakse täpsusega 0,1 mg (kuivatatud emaka mass).
48. Katse lõpetamisel määratud emaka massi võib kasutada selle tõendamiseks, et ebaküpse opereerimata roti katses kasutamise sobivat vanust ei ületatud, kuid laboris kasutatava rotiliini varasemad andmed on selles suhtes otsustava tähtsusega (vt tulemuste tõlgendamine, punkt 56).

Vabavalikulised uuringud

49. Pärast kaalumist võib emaka fikseerida neutraalse puhvriga 10 % formalii-nilahuses, et seda saaks histopatoloogiliselt uurida pärast värvimist hematoksüliini ja eosiiniga. Ka tuppe võib samal viisil uurida (vt punkt 9). Lisaks võib teha morfoomeetrilise mõõtmise endomeetriumi epiteeli kvantitatiivseks võrdlemiseks.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmed**

50. Uuringu andmed peavad hõlmama järgmist:

— loomade arv katse alguses,

— surnuna leitud või katse jooksul humaansetel põhjustel surmatud loomade arv ja koodnumbrid ning iga looma surma või humaanse surmamise kuupäev ja kellaaeg,

— mürgistustunnustega loomade arv ja koodnumbrid ning tunnuste kirjeldus, sealhulgas toksilise toime täheldatud algushetk, kestus ja raskusaste, ning

— kahjustustega loomade arv ja koodnumbrid ning kahjustuste tüübi kirjeldus.

▼ **M5**

51. Iga looma kohta registreeritakse kehamass, märja emaka mass ja kuivatatud emaka mass. Selleks, et teha kindlaks, kas uuritava kemikaali manustamine põhjustas statistiliselt olulise ($p < 0,05$) emaka massi suurenemise, tuleks agonistide puhul kasutada ühepoolset statistilist analüüsi. Kuivatatud emaka massi ja märja emaka massi suurenemist tuleks analüüsida asjakohaste statistiliste meetoditega, et kindlaks teha kemikaali manustamisega seotud suurenemine. Näiteks võib andmeid hinnata kovariatsioonianalüüsi (ANCOVA) lähenemisviisi abil, kus kaasmuutujaks on kehamass lahkamise ajal. Enne andmete analüüsi võib emaka andmed logaritmiliselt teisendada dispersiooni stabiilsuse suurendamiseks. Iga doosirühma paariviisiliseks võrdlemiseks kontrollrühmaga ja usaldusvahemiku leidmiseks sobivad Dunnett ja Hsu test. Võimalike võõrväärtuste leidmiseks ja dispersiooni homogeensuse hindamiseks võib kasutada jääkhälvete töötlemist Studenti teljestikus. Neid meetodeid kasutati OECD valideerimisuurings, milles kasutati statistilise analüüsi süsteemi programmi PROC GLM (SAS Institute, Cary, NC), versioon 8 (6, 7).

52. Lõpp-protokollis esitatakse järgmine.

Uurimislabor:

- vastutavad töötajad ja nende kohustused uuringu tegemisel;
- nulljoone positiivse kontrolli andmed ja perioodilise positiivse kontrolli andmed (vt punktid 26 ja 27).

Uuritav kemikaal:

- uuritava kemikaali iseloomustus;
- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;
- lahjenduste valmistamise meetod ja sagedus;
- kõik andmed, mis on saadud püsivuse kohta;
- kõik manustamislahuste analüüsid.

Kandeaine:

- kandeaine iseloomustus (olek, tarnija ja partii);
- kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

Katseloomad:

- liik, liin ja nende valimise põhjendus;
- tarnija ja tema konkreetne käitis;
- loomade vanus tarnimise ajal ja sünnikuupäev;
- ebaküpsete loomade puhul: kas tarniti koos ema või kasuemaga ja võõrutamise kuupäev;
- loomade kohanemise korra üksikasjad;
- loomade arv puuris;
- üksiklooma ja rühma märgistamise üksikasjad ja meetod.

Katse tingimused:

- randomiseerimise üksikasjad (st kasutatud juhuvaliku meetod);
- doosi valimise põhjendused;

▼ M5

- uuritava kemikaali doseerimisvormi üksikasjad, saavutatud kontsentratsioon, stabiilsus ja homogeensus;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad ja kokkupuuteviisi valiku põhjendus;
- sööt (nimetus, tüüp, tarnija, koostis ja, kui see on teada, fütoöstrogeenide sisaldus);
- vee päritolu (nt kraanivesi või filtritud vesi) ja loomadele kättesaadavaks tegemine (torude kaudu suurest mahutist, pudelitest jne);
- allapanu (nimetus, tüüp, tarnija ja koostis);
- puurides pidamise tingimused, valgustusaeg, ruumi temperatuur ja õhuniiskus, ruumi koristamine;
- lahkamise ja emaka kaalumise korra üksikasjalik kirjeldus;
- statistiliste töötluste kirjeldus.

*Tulemused**Iga looma kohta:*

- iga looma kehamass igal päeval (rühmadesse jagamisest kuni lahkamiseni) (täpsusega 0,1 g);
- iga looma vanus (päevades, lugedes sündimise päeva 0-päevaks) selleks ajaks, kui algas uuritava kemikaali manustamine;
- iga doosi manustamise kuupäev ja kellaaeg;
- manustatud doosi suurus ja arvatud ruumala ning kõik tähelepanekud kadude kohta doosi manustamisel või pärast manustamist;
- igapäevased andmed looma olukorra kohta, kõik asjakohased sümptomid ja tähelepanekud;
- oletatav surma põhjus (kui loom uuringu ajal oli suremas või suri);
- humaanse surmamise kuupäev ja kellaaeg ning ajavahemik pärast viimast manustamist;
- märja emaka mass (täpsusega 0,1 mg), tähelepanekud valendikus olnud vedeliku kadude kohta lahkamise ja kaalumiseks ettevalmistamise ajal;
- kuivatatud emaka mass (täpsusega 0,1 mg).

Iga loomade rühma kohta:

- keskmine kehamass igal päeval (täpsusega 0,1 g) ja standardhälbed (rühmadesse määramisest kuni lahkamiseni);
- keskmine märja emaka mass ja keskmine kuivatatud emaka mass (täpsusega 0,1 mg) ja standardhälbed;
- kui mõõdeti, siis igapäevane sööda tarbimine (arvatuna tarbitud sööda grammides looma kohta);

▼ **M5**

- statistilise analüüsi tulemused, milles on võrreldud märja emaka ja kuivatatud emaka massi doosirühmades ja kandeainet saanud rühmades;
- statistilise analüüsi tulemused, milles on võrreldud doosirühmade loomade üldist kehamassi ning kehamassi suurenemist märja emaka ja kuivatatud emaka massiga ja kõrvutatud neid tulemusi kandeainet saanud kontrollrühmade asjaomaste näitajatega.

53. Katsemeetodi oluliste suunavate faktide kokkuvõte

	Rott	Hiir
Loomad		
Liin	Tavaliselt kasutatav laborinäriiliste liin	
Loomade arv	Vähemalt 6 looma ühes doosirühmas	
Rühmade arv	Vähemalt 2 doosirühma (vt punkt 33 juhiste saamiseks) ja negatiivne kontrollrühm Vt punktid 26 ja 27, juhised positiivse kontrollkatse rühmade kohta	
Pidamis- ja söötmistingimused		
Loomade ruumi T°	22 °C ± 3 °C	
Suhteline õhuniiskus	50–60 %, mitte alla 30 % ega üle 70 %	
Ööpäeva valgustusrežiim	12 tundi valgust, 12 tundi pimedust	
Sööt ja joogivesi	Ad libitum	
Majutus puurides	Üksi või kuni kolmest loomast koosnevate rühmadena (ebaküpsid loomi soovitatakse pidada sotsiaalsete rühmadena)	
Sööt ja allapanu	Sööda ja allapanu fütoöstrogeenide sisaldus peaks olema väike	
Katse-eeskiri		
Meetod	Ebaküpsede eemaldamata munasarjadega loomade meetod (eelistatud valik). Eemaldatud munasarjadega täiskasvanud emasloomade meetod	Eemaldatud munasarjadega täiskasvanud emasloomade meetod
Ebaküpsede loomade vanus dooside manustamisel	Vähemalt PND 18. Dooside manustamine tuleb lõpetada enne päeva PND 25.	Praeguse meetodi puhul ei ole asjakohane.
Vanus munasarjade eemaldamisel	Vanuses 6–8 nädalat.	
Eemaldatud munasarjadega loomade vanus dooside manustamisel	Munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel peaks olema vähemalt 14 päeva.	Munasarjade eemaldamise ja esimese doosi manustamise vahel peaks olema vähemalt 7 päeva.
Kehamass	Kehamassi erinevused peaksid olema minimaalsed, mitte üle ±20 % keskmisest kehamassist	

▼ M5

	Rott	Häär
Doseerimine		
Manustamistee	Suukaudne sond või nahaalne süst	
Manustamise sagedus	Ühekordne päevane doos	
Sondiga ja süstimisega manustatav ruumala	≤ 5 ml kehamassi kg kohta (või vesilahuste puhul kuni 10 ml kehamassi kg kohta) (kahte süstimiskohta nahaaluse manustamise puhul)	
Manustamise kestus	Ebaküpsete loomade puhul 3 järjestikusel päeval OVX-loomade puhul vähemalt 3 järjestikusel päeval	OVX-loomade puhul 7 järjestikusel päeval
Lahkamisaeg	Ligikaudu 24 tundi pärast viimast doosi	
Tulemused		
Positiivne vastus	Keskmise emakamassi statistiliselt oluline suurenemine (märja ja/või kuivatatud emaka mass)	
Võrdlusöstrogeen	17 α -etinüülöstradiol	

TULEMUSTE TÖLGENDAMISE JA KEHTIVAKS TUNNISTAMISE JUHISED

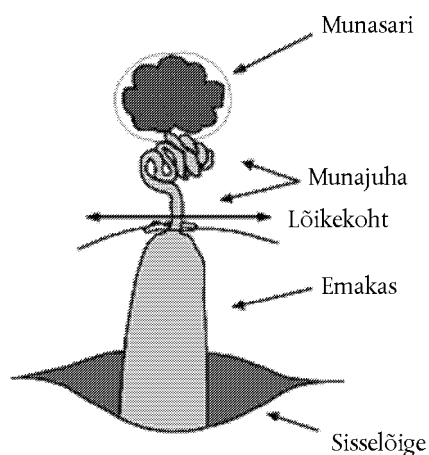
54. Üldiselt tuleks östrogeensuse test lugeda positiivseks, kui tuvastatakse statistiliselt oluline emakamassi suurenemine ($p < 0,05$) vähemalt suure doosi rühmas, võrreldes lahusti kontrollrühmaga. Positiivset tulemust toetab täiendavalt bioloogiliselt usutav sõltuvus doosi ja toime ulatuse vahel, pidades aga silmas, et uuritava kemikaali kattuvad östrogeensed ja antiöstrogeensed toimed võivad mõjutada uuritava kemikaali doosi-toime sõltuvuse kuju.
55. Tuleb jälgida, et ei ületataks suurimat talutavat doosi, et andmeid oleks võimalik mõistlikult tõlgendada. Selles suhtes tuleks hoolikalt hinnata kehamassi vähenemist, kliinilisi tunnuseid ja muid tähelepanekuid.
56. Oluline asjaolu uterotroofse biokatse tulemuste kehtivaks tunnistamisel on emaka mass kandeaine kontrollrühma liikmetel. Suur emaka mass kontrollrühma liikmetel võib panna kahtluse alla biokatse tundlikkuse ja võime tuvastada väga nõrku östrogeeni agoniste. Kirjandusülevaated ja uterotroofse biokatse valideerimise käigus kogutud andmed osutavad, et kontrollrühma emakamassi kõrge keskmine esineb spontaanselt, eriti ebaküpsete loomade puhul (2, 3, 6, 9). Kuna ebaküpse roti emaka mass sõltub mitmest muutujast, nagu stress või kehamass, ei ole võimalik anda kindlat emaka massi ülempiiri. Juhendumiseks: kui ebaküpsete rottide kontrollrühmas emaka mass on 40–45 mg, tuleks tulemusi pidada kahtlaseks, ja emaka mass üle 45 mg võib tähendada, et katset tuleks korrata. Siiski tuleb seda kaalutleda iga juhtumi puhul eraldi (3, 6, 8). Täiskasvanud rottidega katsete tegemisel võib munasarjade puudulikul eemaldamisel jääda alles munasarjakude, mis võib nõrendada endogeenseid östrogeene ja aeglustada emakamassi taandarengut.

▼ M5

57. Kandeaine kontrollrühma kuivatatud emaka mass, mis on väiksem kui 0,09 % roti ebaküpse emaslooma kehamassist ja väiksem kui 0,04 % roti eemaldatud munasarjadega noore täiskasvanud emaslooma kehamassist, näib andvat vastuvõetavaid tulemusi (vt tabel 31 (2)). Kui kontrollrühmas on emaka mass suurem kui kõnealused arvud, tuleks analüüsida eri tegureid, nagu loomade vanus, munasarjade eemaldamise nõuetekohasus, söödaga saadavad fütoöstrogeenid jne), ja katse negatiivset tulemust (östrogeense toime puudumine) tuleks võtta ettevaatusega.
58. Laboris tuleks säilitada võrdlusrühmade kohta kogutud varasemad andmed. Samuti tuleks laboris säilitada andmed selliste võrdlusöstrogeenide nagu 17 α -etiinülöstradiool poolt esilekutsutud reaktsiooni kohta. Labor võib teha katseid ka teadaolevalt nõrga östrogeeni agonisti reaktsiooni määramiseks. Kõiki neid andmeid võib võrrelda kättesaadavate andmetega (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8), et veenduda selles, et labori meetod on piisavalt tundlik.
59. Kuivatatud emaka massi varieeruvus oli OECD valideerimisuurings väiksem kui märja emaka massi puhul (6, 7). Kuid kummagi näitaja väärtuste tugev suurenemine viitab siiski sellele, et uuritav aine on östrogeense toime poolest positiivne.
60. Uterotroofne reaktsioon ei ole täielikult östrogeense päritoluga, kuid uterotroofse biokatse positiivset tulemust tuleks üldiselt tõlgendada kui tõendit võimaliku östrogeensuse kohta *in vivo*, ja see peaks tavaliselt andma põhjust selle küsimuse edasiseks täpsustamiseks (vt punkt 9 ning „Sisesekreetsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik“, 2. lisa).

Joonis 1

Skeem munasarjade kirurgilise eemaldamise kohta



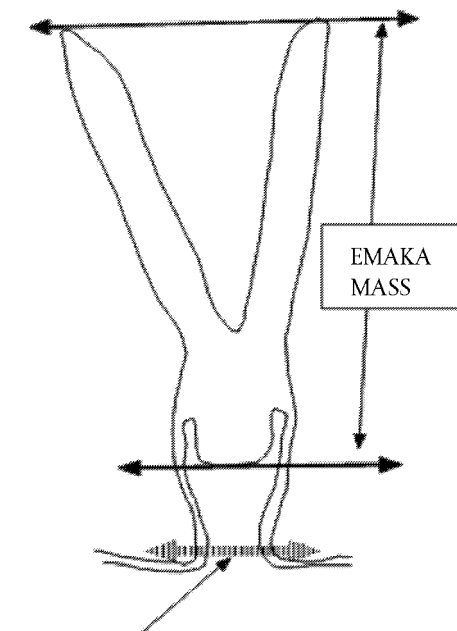
Mesomeetriumi, veresooni ega
rasvpadjandit ei ole näidatud

Operatsioon algab kõhuõõne dorsolateralse seina avamisega alumise roidekaare ja niudeluuharja vahelise ala keskpunktis ning mõne millimeetri kaugusel niudelihase välimisest servast. Kõhuõõnes tuleks leida munasarjad. Munasarjad eemaldatakse seejärel füüsiliselt kõhuõõnest aseptilisele alale, munasarja ja emaka vahele pannakse ligatuur verejooksu vältimiseks ning munasari eemaldatakse sisselõikega ligatuuri kohalt kummagi munajuha ja emakasarve ühinemiskohast. Kui on tehtud kindlaks, et olulist püsivat verejooksu ei ole, tuleks kõhuõõne sein sulgeda õmblusega ja nahahaav sulgeda klambrite või õmblusega. Loomadel lastakse paraneda ja emakal taandareneda vähemalt 14 päeva enne katses kasutamist.

▼ M5

Joonis 2

Emakakudede eemaldamine ja ettevalmistamine massi määramiseks.



Eraldusjoon lahkamisel

Tööd alustatakse kõhuseina avamisega alates häbemeliidusest. Seejärel eraldatakse kumbki munasari ja emakasarv kõhuõõne dorsaalse seina küljest. Emaka ja tupe ventraalselt ja lateraalselt küljelt eemaldatakse kusepõis ja kusejuhad. Kiulised ühendused pära ja tupe vahel eraldatakse, kuni võib näha tupesuudme ja lahkliha naha ühenduskohta. Emakas ja tupp eraldatakse kehast tupeseina läbilõikamisega otse lahklihanahaga ühenduse kohalt, nagu on näidatud joonisel. Emakas tuleks kõhuseinast eraldada emaka kinnisti (mesenteeriumi) ettevaatliku läbilõikamisega selle kinnituskohalt kummagi emakasarve dorsolateraalse külje kogu pikkuses. Pärast emaka eemaldamist lõigatakse ära liigne rasv ja sidekude. Kui munasarjad on alles, eemaldatakse need munajuha juurest, vältides valendikus oleva vee väljavoolamist emakasarvest. Kui loomal on munasarjad eemaldatud, tuleks munasarjade kunagisi kinnituskohti uurida munasarjakoe leidmiseks. Tupp eraldatakse emakast veidi allpool emakakaela, nii et emakakael jääb emakakeha juurde, nagu on näidatud joonisel. Emaka võib seejärel kaaluda.

▼ **M5**

1. liide

MÕISTED

Antiöstrogeensus – kemikaali võime alla suruda 17 β -etinüülöstradioli toimet imetajate organismile.

Doos – manustatav uuritava kemikaali kogus. Uterotroofse biokatse puhul väljendatakse doosi uuritava kemikaali massina katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (nt mg kehamassi kg kohta päevas).

Doseerimine – üldmõiste, mis hõlmab doosi, dooside manustamise sagedust ja kestust.

Kemikaal – aine või segu.

Maksimaalne talutav doos (*Maximum Tolerable Dose, MTD*) – suurim kemikaali kogus, mis katselooma kehasse viiduna ei põhjusta katselooma surma (tähis LD₀) (IUPAC, 1993).

Spetsiifilisus – kõikide negatiivsete/toimeta ainete osakaal, mis katsemeetodi abil klassifitseeritakse õigesti. See on tõhususe näitaja katsemeetodi puhul, mis näitab selgeid tulemusi andva katsemeetodi täpsust ja on oluline katsemeetodi asjakohasuse hindamisel.

Sünnijärgne päev X – X. elupäev pärast sünnikuupäeva.

Sünnikuupäev – sünnijärgne päev 0 (PND 0).

Tundlikkus – kõikide positiivsete/toimivate ainete osakaal, mis klassifitseeritakse katsemeetodi abil õigesti. Tundlikkus näitab selgeid tulemusi andva katsemeetodi täpsust ja on oluline katsemeetodi asjakohasuse hindamisel.

Uterotroofne – termin, millega kirjeldatakse positiivset mõju emaka kudede kasvule.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Östrogeensus – kemikaali võime avaldada imetaja organismile 17 β -etinüülöstradioli omaga sarnanevat toimet.

Valideerimine – teaduslik menetlus, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi läbiviimise nõudeid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja asjakohasust konkreetse eesmärgi saavutamiseks.

2. liide

Märkus: dokumendi on koostanud juhenddokumentide programmi sekretariaat vastavalt kokkuleppele, mis saavutati EDTA töörühma 6. koosolekul

Sisesekreetsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik

<p>Tase 1 Sortimine ja prioriteedi omistamine olemasoleva teabe põhjal</p>	<ul style="list-style-type: none"> — füüsilised ja keemilised omadused, nt molekulmass, reaktsioonivõime, lenduvus, biolagunevus — inimese ja keskkonna kokkupuude, nt tootmismahd, heide keskkonda, kasutusviisid — ohud, nt olemasolevad toksikoloogiaandmed
<p>Tase 2 <i>In vitro</i> katsed, mis annavad andmeid mehhanismi kohta</p>	<ul style="list-style-type: none"> — ÖR, AR, TR retseptorile sidumise afiinsus — Transkriptsiooni aktiveerimine — Aromataas ja steroidogenees <i>in vitro</i> — Arüülsüsiivesinike retseptori äratundmine/sidumine — kvantit. strukt.-aktiivsuse sõltuvused (QSAR) — Suure jõudlusega sõeluuringud — Kilpnäärmefunktsioon — Kala hepatotsüütide vitellogeniini (VTG) katse — Muud (vastavalt vajadusele)
<p>Tase 3 <i>In vivo</i> assays katsed, mis annavad andmeid ühe hormooni kohta Mehhanismid ja toimed</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Uterotroofne katse (östrogeenid) — Hershbergeri katse (androgeenid) — Hormooni retseptorisõltumatu toime — Muud (nt kilpnääre) — Kala VTG (vitellogeniin) katse (östrogeenid)
<p>Tase 4 <i>In vivo</i> assays katsed, mis annavad andmeid mitme hormooni kohta Mehhanismid ja toimed</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Tõhustatud OECD 407 (näitajad põhinevad endokriinmehhanismidel) — Isas- ja emasloomade puberteedikatsed — Täiskasvanud opereerimata isasloomade katse — Kala sugunäärmete histopatoloogia katse — Kullese metamorfoosi katse
<p>Tase 5 <i>In vivo</i> katsed, mis annavad andmeid endokriinse jm mehhanismi põhjustatud toime kohta</p>	<ul style="list-style-type: none"> — 1-põlvkonna-katse (tõhustatud TG415)¹ — 2-põlvkonna-katse (tõhustatud TG416)¹ — reproduktiivõelumiskatse (tõhustatud TG421)¹ — kombineeritud 28 päeva / reproduktiivõelumise katse (tõhustatud TG422)¹ — Osalise ja täiseluringi katsed kalade, lindude, kahepaiksete ja selgrootutega (areng ja paljunemine)
<p>¹ VMG mamm kaalub võimalikke tõhustamisi</p>	

VMG mamm: imetajatega tehtavate katsete valideerimist ja hindamist juhtiv rühm

▼ M5**MÄRKUSED RAAMISTIKU JUURDE**

- Märkus 1:* kõigile tasemetele on võimalik siseneda ja kõigilt tasemetelt on võimalik väljuda; see oleneb sellest, millist teavet on vaja saada ohtude ja riskide hindamiseks.
- Märkus 2:* tasemel 5 peaks ökotoksikoloogia hõlmama näitajaid, mis näitavad kahjuliku mõju mehhanisme ja võimalikku kahju elanikkonna jaoks.
- Märkus 3:* kui mitme näitaja kohta tulemusi andev katsemudel hõlmab näitajaid, mida määratakse ühe näitaja kohta tulemusi andva katsega, peaks nimetatud mudel asendada ühe näitaja kohta tulemusi andva katsed.
- Märkus 4:* iga kemikaali tuleks eraldi hinnata, võttes arvesse kogu olemasolevat teavet ja pidades silmas raamistiku tasemete funktsiooni.
- Märkus 5:* praegust raamistikku ei tuleks käsitleda kõike hõlmavana. Tasemetel 3, 4 ja 5 hõlmab raamistik katseid, mis on juba kättesaadavad või valideerimine on käimas. Viimast asjaolu arvestades on need ajutiselt lisatud. Kui need on välja töötatud ja valideeritud, saab need ametlikult lisada raamistikku.
- Märkus 6:* raamistikust ei tohiks niimoodi aru saada, et tasemel 5 on üksnes lõplikud katsed. Arvestatakse, et osutatud tasemel olevad katsed aitavad kaasa üldisele ohtude ja riskide hindamisele.

▼ **M5****KIRJANDUS**

- 1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- 2) OECD (2003). Detailed Background Review of the Uterotrophic Bioassay: Summary of the Available Literature in Support of the Project of the OECD Task Force on Endocrine Disrupters Testing and Assessment (EDTA) to Standardise and Validate the Uterotrophic Bioassay. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 38. ENV/JM/MONO(2003)1.
- 3) Owens JW, Ashby J. (2002). Critical Review and Evaluation of the Uterotrophic Bioassay for the Identification of Possible Estrogen Agonists and Antagonists: In Support of the Validation of the OECD Uterotrophic Protocols for the Laboratory Rodent. Crit. Rev. Toxicol. 32:445–520.
- 4) OECD (2006). OECD Report of the Initial Work Towards the Validation of the Rodent Uterotrophic Assay — Phase 1. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 65. ENV/JM/MONO(2006)33.
- 5) Kanno, J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. (2001). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for *in vivo* estrogenic responses: Phase 1. Environ Health Perspect. 109:785–94.
- 6) OECD (2006). OECD Report of the Validation of the Rodent Uterotrophic Bioassay: Phase 2 — Testing of Potent and Weak Oestrogen Agonists by Multiple Laboratories. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 66. ENV/JM/MONO(2006)34.
- 7) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dose Response Studies. Environ. Health Persp.111:1530-1549
- 8) Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Coded Single Dose Studies. Environ. Health Persp.111:1550-1558.
- 9) Owens W, Ashby J, Odum J, Onyon L. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: Phase Two — Dietary phytoestrogen analyses. Environ. Health Persp. 111:1559-1567.
- 10) Ogasawara Y, Okamoto S, Kitamura Y, Matsumoto K. (1983). Proliferative pattern of uterine cells from birth to adulthood in intact, neonatally castrated, and/or adrenalectomized mice assayed by incorporation of [¹²⁵I]iododeoxyuridine. Endocrinology 113:582–587.
- 11) Branham WS, Sheehan DM, Zehr DR, Ridlon E, Nelson CJ. (1985). The postnatal ontogeny of rat uterine glands and age-related effects of 17 β -estradiol. Endocrinology 117:2229-2237.
- 12) Schlumpf M, Berger L, Cotton B, Conscience-Egli M, Durrer S, Fleischmann I, Haller V, Maerkel K, Lichtensteiger W. (2001). Estrogen active UV screens. SÖFW-J. 127:10–15.
- 13) Zarrow MX, Lazo-Wasem EA, Shoger RL. (1953). Estrogenic activity in a commercial animal ration. Science 118:650–651.
- 14) Drane HM, Patterson DSP, Roberts BA, Saba N. (1975). The chance discovery of oestrogenic activity in laboratory rat cake. Fd. Cosmet. Toxicol. 13:425–427.
- 15) Boettger-Tong H, Murphy L, Chiappetta C, Kirkland JL, Goodwin B, Adlercreutz H, Stancel GM, Makela S. (1998). A case of a laboratory animal feed with high estrogenic activity and its impact on *in vivo* responses to exogenously administered estrogens. Environ. Health Perspec.106:369–373.

▼ M5

- 16) OECD (2007). Additional data supporting the Test Guideline on the Uterotrophic Bioassay in rodents. OECD Environmental Health and Safety Publication Series on Testing and Assessment No. 67.
- 17) Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM. (2002). Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol. Lett.* 128:145–157.
- 18) Wade MG, Lee A, McMahon A, Cooke G, Curran I. (2003). The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem. Toxicol.* 41:1517-1525.
- 19) Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Wada T, Hara T, Takatsuki M. (2002). Immature uterotrophic assay of estrogenic compounds in rats given different phytoestrogen content diets and the ovarian changes in the immature rat uterotrophic of estrogenic compounds with ICI 182,780 or antide. *Arch. Toxicol.* 76:613–620.
- 20) Thigpen JE, Haseman JK, Saunders HE, Setchell KDR, Grant MF, Forsythe D. (2003). Dietary phytoestrogens accelerate the time of vaginal opening in immature CD-1 mice. *Comp. Med.* 53:477–485.
- 21) Ashby J, Tinwell H, Odum J, Kimber I, Brooks AN, Pate I, Boyle CC. (2000). Diet and the aetiology of temporal advances in human and rodent sexual development. *J. Appl. Toxicol.* 20:343–347.
- 22) Thigpen JE, Lockear J, Haseman J, Saunders HE, Caviness G, Grant MF, Forsythe DB. (2002). Dietary factors affecting uterine weights of immature CD-1 mice used in uterotrophic bioassays. *Cancer Detect. Prev.* 26:381–393.
- 23) Thigpen JE, Li L-A, Richter CB, Lebetkin EH, Jameson CW. (1987). The mouse bioassay for the detection of estrogenic activity in rodent diets: I. A standardized method for conducting the mouse bioassay. *Lab. Anim. Sci.* 37:596–601.
- 24) OECD (2008). Acute oral toxicity — up-and-down procedure. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- 25) OECD (2000). Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- 26) OECD (2001). Guidance document on acute oral toxicity. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- 27) Bulbring, E., and Burn, J.H. (1935). The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J. Physiol.* 85: 320 — 333.
- 28) Dorfman, R.I., Gallagher, T.F. and Koch, F.C (1936). The nature of the estrogenic substance in human male urine and bull testis. *Endocrinology* 19: 33 — 41.
- 29) Reel, J.R., Lamb IV, J.C. and Neal, B.H. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam. Appl. Toxicol.* 34: 288 — 305.
- 30) Jones, R.C. and Edgren, R.A. (1973). The effects of various steroid on the vaginal histology in the rat. *Fertil. Steril.* 24: 284 — 291.
- 31) OECD (1982). Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice, ISBN 92–64-12367-9, Paris.
- 32) Dorfman R.I. (1962). *Methods in Hormone Research*, Vol. II, Part IV: Standard Methods Adopted by Official Organization. New York, Academic Press.
- 33) Thigpen J. E. et al. (2004). Selecting the appropriate rodent diet for endocrine disruptor research and testing studies. *ILAR J* 45(4): 401–416.

▼M5

- 34) Gray L.E. and Ostby J. (1998). Effects of pesticides and toxic substances on behavioral and morphological reproductive development: endocrine versus non-endocrine mechanism. *Toxicol Ind Health*. 14 (1–2): 159–184.
- 35) Booth AN, Bickoff EM and Kohler GO. (1960). Estrogen-like activity in vegetable oils and mill by-products. *Science* 131:1807-1808.
- 36) Kato H, Iwata T, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2004). Evaluation of estrogenic activity in diets for experimental animals using in vitro assay. *J. Agric Food Chem*. 52, 1410-1414.
- 37) OECD (2007). Guidance Document on the Uterotrophic Bioassay Procedure to Test for Antioestrogenicity. Series on Testing and Assessment. No. No. 71.
- 38) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).

▼ **M5**

**B.55. HERSHBERGERI BIOKATSE ROTTIDEL: KIIRE
SÖELKATSE (ANTI)ANDROGEENSETE OMADUSTE
VÄLJASELGITAMISEKS**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 441 (2009). OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et söeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekretsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid (1). Üks tegevussuund oli töötada välja rotiga tehtava Hershbergeri biokatse juhend. Pärast mitme aastakümne pikkust kasutamist ravimitööstuses standarditi see katse kõigepealt ametliku eksperdikomitee poolt 1962. aastal söelkatsena androgeense toimega kemikaalide väljaselgitamiseks (2). Aastatel 2001–2007 läbis rotiga tehtav Hershbergeri biokatse ulatusliku valideerimisprogrammi, mille käigus koostati üksikasjalik taustadokument (23), põhjalik artikkel (3) meetodite kohta, arendati välja lahkamise juhendid (21) ning tehti ulatuslikud laborisisesed ja laboritevahelised uuringud, et näidata biokatse asjakohasust ja reprodutseeritavust. Nimetatud uuringud viidi läbi tugeva võrdlusandrogeeniga (testosteroonpropionaat (TP)), kahe tugeva sünteetilise androgeeniga (trenboloonatsetaat ja metüültestosteroon), ühe tugeva antiandrogeense ravimiga (flutamiid), loodusliku androgeeni (dihüdrotestosteroon, DHT) sünteesi tugeva inhibiitoriga (finasteriid), mitme nõrgalt antiandrogeense pestitsiidiga (linuroon, vinklosoliin, protsümidoon, *p,p'*-DDE), tugeva 5 α -reduktaasi inhibiitoriga (finasteriid) ja kahe teadaoleva toimeta (negatiivse) kemikaaliga (dinitrofenool ja nonüülfenool) (4, 5, 6, 7, 8). Käesolevas katsemeetodis on võetud kokku pikaajaliste biokatsetega saadud kogemused ning valideerimisprogrammi käigus saadud kogemused ja saavutatud tulemused.
2. Hershbergeri biokatse on kiire *in vivo* söelkatse, milles kasutatakse isassuguorganite kudesid. Katse töötati välja 1930. aastatel ja 1940. aastatel seda muudeti, et lisada ka isassuguorganite androgeenitundlikud lihased (2, 9–15). 1960. aastatel hinnati katse-eeskirja standarditud versiooni kasutades enam kui 700 võimalikku androgeeni (2, 14); sel ajal peeti seda katset nii androgeenide kui ka antiandrogeenide määramise standardmeetodiks (2, 15). Praegune biokatse põhineb enne puberteeti kastreeritud isasrottide viie androgeenisõltuva koe massi muutustel. Sellega hinnatakse, kas kemikaal kutsus esile bioloogilisi toimeid, mis on kooskõlas androgeeni agonistide, antagonistide või 5 α -reduktaasi inhibiitorite toimega. Viis androgeenisõltuvat kude, mida hõlmab käesolev katsemeetod, on ventraalne eesnääre (*ventral prostate*, VP), seemnepõis (*seminal vesicle*, SV) (pluss vedelikud ja koagulatsiooninäärmed), lihas *levator ani-bulbocavernosus* (LABC), paarilised Cowperi näärmed (COW) ja suguti pea (*glans penis*, GP). Enne puberteeti kastreeritud isasrottidel reageerivad kõik need viis kude androgeenide absoluutse massi suurenemisega. Samas kui nende kudede stimuleerimine tugeva võrdlusandrogeeniga suurendab nende massi, väheneb kõigi nende viie koe mass antiandrogeenide toimel. Hershbergeri biokatse esmane mudel oli enne puberteeti kirurgiliselt kastreeritud isasrott; seda mudelit valideeriti Hershbergeri valideerimisprogrammide etappidel 1, 2 ja 3.
3. Biokatset saab kasutada androgeeni agonistide, antagonistide ja 5 α -reduktaasi inhibiitorite rutiinseks *in vivo* söeluuringuks ja selle kasutamist tuleks vaadelda „Sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalse raamistiku” (2. liide) kontekstis. Selles

▼ M5

kontseptuaalses raamistikus on Hershbergeri biokatse 3. tasemel kui *in vivo* katse, mis annab andmeid üheainsa sisesekretsioonimehhanismi, nimelt (anti)androgeensuse kohta. Hershbergeri biokatse on kavandatud osana *in vitro* ja *in vivo* katsetest, millega tehakse kindlaks endokriinsüsteemi mõjutada võivaid kemikaale, et hinnata ohtusid inimese tervisele ja keskkonnale.

4. Kuna loomade kastreerimise operatsioon on küsitav loomade heaolu seisukohast, püüti alternatiivse mudelina hakata kasutama opereerimata (kastreerimata) võõrutamises isasrotte, et vältida Hershbergeri biokatses kastreerimisetaapi. Võõrutuseas isasloomade katsemeetod valideeriti (24); kuid valideerimisuuringus selgus, et Hershbergeri biokatse võõrutamises isasloomade versiooniga ei ole võimalik järjekindlalt avastada nõrkade antiandrogeenide kasutatud kontsentratsioonide mõju androgeenisõltuvate kudede massile. Seetõttu ei hõlma käesolev katsemeetod seda versiooni. Kuna aga selle kasutamine võib olla oluline mitte ainult loomade heaolu seisukohast, vaid võib anda ka teavet muude toimeviiside kohta, on see kättesaadav OECD juhenddokumendis 115 (25).

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

5. Androgeeni agonistid ja antagonistid toimivad androgeenireseptorite ligandidena ja võivad vastavalt aktiveerida või pidurdada retseptorite poolt kontrollitavat transkriptsiooni. Lisaks takistavad mõned kemikaalid testosterooni muutmist mõjusamaks looduslikuks androgeeniks dihidrotestosterooniks mõnes androgeeni sihtkoes (5 α -reduktaasi inhibiitorid). Sellised kemikaalid võivad põhjustada tervisekahjustusi, sealhulgas reproduktiivfunktsiooni ja arengu häireid. Seepärast on regulatiivsetel eesmärkidel vaja kiiresti hinnata kemikaale kui võimalikke androgeeni agoniste või antagonistide või 5 α -reduktaasi inhibiitorideid. Kuigi ligandi afiinsus androgeenireseptori suhtes, mida mõõdetakse retseptorile sidumise või reportergeenide transkriptsiooni aktiveerimise kaudu *in vitro*, annab küll olulist teavet, ei ole see siiski mitte ainus võimalik ohtu põhjustav tegur. Muud tegurid hõlmavad metabolismi aktiveerimist ja inaktiveerimist pärast kehasse sisenemist, kemikaalide jaotumist sihtkudedesse ja väljutamist kehast. Seepärast on vaja kontrollida kemikaali võimalikku mõju *in vivo* asjakohastes tingimustes ja asjakohase kokkupuute korral. *In vivo* hindamine on vähem oluline, kui kemikaali sellised omadused, mis on seotud neeldumise, jaotumise, metabolismi ja väljutamisega, on teada. Androgeenisõltuvad koed reageerivad androgeeniga stimuleerimisele kiire ja jõulise kasvuga, eriti enne puberteeti kastreeritud isasrottide puhul. Närlisi, eriti rotte, kasutatakse laialdaselt ka mürgisuse uuringutes ohu iseloomustamiseks. Seepärast sobib biokatse käesolev versioon, milles kasutatakse enne puberteeti kastreeritud rotte ja viit sihtkude, androgeeni agonistide, antagonistide või 5 α -reduktaasi inhibiitorite *in vivo* sõelkatseks.
6. Käesolev katsemeetod põhineb OECD valideerimisuuringus kasutatud katse-eeskirjadel, mis osutusid usaldusväärseks ja korratavaks nii laborisistes kui ka laboritevahelistes uuringutes (4, 5, 6, 7, 8). Käesolevas katsemeetodis on esitatud nii androgeeni kui ka antiandrogeeni määramise meetod.
7. Kuigi testosteroonpropionaadi (TP) doos, mida kasutati antiandrogeenide määramiseks OECD Hershbergeri biokatse valideerimisprogrammis, oli eri laborites erinev (0,2 ja 0,4 mg/kg/päevas, nahaalne süst), ei olnud nende kahe katse-eeskirja versioonide vahel suuri erinevusi nõrga või tugeva antiandrogeense aktiivsuse tuvastamises. Siiski on selge, et TP doos ei tohiks olla liiga kõrge, et takistada nõrkade androgeenireseptori (AR) antagonistide mõju, ega liiga madal, nii et androgeenitundlike kudede kasv on liiga väike isegi ilma antiandrogeeni samaaegse manustamiseta.

▼M5

8. Üksikute androgeenitundlike kudede reaktsioon ei ole siiski täielikult tingitud androgeenist, st ka muud kemikaalid kui androgeeni antagonistid võivad muuta teatavate kudede massi. Mitme koe samaaegne kasv siiski tõendab androgeenispetsiifilist mehhanismi. Näiteks tugevad östrogeenid suures doosis võivad suurendada seemnepõiekestest massi; muud androgeenisõltuvad koed ei reageeri aga sarnasel viisil. Antiandrogeense toimega kemikaalid võivad toimida kas androgeenireseptori antagonistidena või 5 α -reduktaasi inhibiitoritena. 5 α -reduktaasi inhibiitorid on mitmesuguse mõjuga, kuna muundamine tugevama toimega dihidrotestosterooniks on eri kudedes erinev. Antiandrogeenidel, nagu finasteriid, mis inhibeerivad 5 α -reduktaasi, on suurem mõju ventraalses eesnäärmes kui muudes kudedes, kui võrrelda sellise androgeenireseptori tugeva antagonistiga nagu flutamiid. Seda erinevust kudede reaktsioonis võib kasutada androgeenireseptorist sõltuva ja 5 α -reduktaasist sõltuva toime eristamiseks. Lisaks sellele on androgeenireseptor evolutsiooniliselt suguluses muude steroidhormoonide retseptoritega, ja kui mõnda muud hormooni manustatakse suures, füsioloogilist taset kaugelt ületavas doosis, võib see siduda end retseptoriga ja toimida testosteroonpropionaadi põhjustatava kasvu stimuleerimise antagonistina (13). Lisaks on ka usutav, et tõhustatud steroidide metabolism ja sellest tingitud seerumi testosteroonisalduse vähenemine võib vähendada androgeenisõltuvate kudede kasvu. Seepärast tuleb Hershbergeri biokatse positiivse tulemuse hindamisel tavaliselt lähtuda sellest, kui kaalukad on tõendid, sealhulgas *in vitro* katsed, nagu androgeenireseptori ja östrogeenireseptori sidumise katsed ja vastavad transkriptsiooni aktivatsiooni katsed või muud *in vivo* katsed, millega uuritakse sarnaseid androgeeni sihtkudesid, nagu isaslooma puberteedikatse, 15-päevane opereerimata täiskasvanud isaslooma katse või 28-päevane või 90-päevane korduvdoosi uuring.
9. Kogemused näitavad, et ksenobiootilisi androgeene esineb harvemini kui ksenobiootilisi antiandrogeene. Seepärast eeldatakse, et Hershbergeri biokatset kasutatakse kõige sagedamini antiandrogeenide leidmise sõelkatseks. Androgeenide tuvastamise katset võib sellele vaatamata siiski soovitada steroidsete või steroidisarnaste kemikaalide või selliste kemikaalide puhul, mille võimaliku androgeense mõju kohta on saadud viiteid meetoditega, mis on kontseptuaalse raamistiku (2. liide) 1. või 2. tasemel. Sarnaselt sellega võib (anti)androgeense profiiliga seotud kahjulikke mõjusid leida 5. taseme uuringutega, mistõttu tuleb hinnata, kas kemikaal toimib endokriinse mehhanismi kaudu.
10. Meetodi kasutamisel arvestatakse, et kõik katsed loomadega peavad vastama loomade hooldamise kohalikele normidele; järgmised loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele ning kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (26), on nende suhtes ülimuslikud. OECD on esitanud loomade humaanse kohtlemise täiendavad juhendid (17).
11. Nagu iga biokatse puhul, milles kasutatakse katseloomi, tuleb hoolikalt kaaluda, kas uuringut on üldse vaja teha. Sellise otsuse tegemiseks võib põhimõtteliselt olla kaks põhjust:
- suur oht kokkupuuteks (kontseptuaalne raamistik, 1. tase) või kaused andmed kemikaali (anti)androgeensuse kohta *in vitro* katsetest (2. tase), mille tõttu on vaja täiendavalt uurida, kas selline mõju võib esineda *in vivo*;
 - (anti)androgeensusele osutav mõju 4. või 5. tasemel *in vivo* katsetes ja on vaja täiendavaid uuringuid konkreetse toimeviisi selgitamiseks, näiteks tõendamiseks, et mõju aluseks on (anti)androgeenne mehhanism.

▼ M5

12. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted on määratletud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

13. Hershbergeri biokatse on tundlik, kuna selles kasutatakse isasloomi, kelle endogeense androgeeni nõristumine on minimaalne. See saavutatakse kastreeritud isasloomade kasutamisega tingimusel, et pärast kastreerimist on möödunud piisavalt aega ning sihtkoed on taandarenenud miinimumini ja arvestatakse ühesugust nulljoonele vastavat massi. Seega on võimaliku androgeense toime avastamise sõeluuringu tegemisel veres ringleva endogeense androgeeni sisaldus madal, hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete telg ei suuda seda tagasisidemehhanismide kaudu kompenseerida, kudede võime androgeenile reageerida on viidud maksimumini ja lähtekoe mass miinimumini. Võimalike antiandrogeenide otsimisel võib saavutada kooskõlalisema kudede massi suurenemise, kui kudesid stimuleeritakse võrdlusandrogeeniga. Selle tulemusel on Hershbergeri biokatses vaja ainult 6 looma doosirühma kohta, samal ajal kui muudes katsetes opereerimata puberteedialiste või täiskasvanud isasloomadega soovitatakse kasutada 15 isaslooma igas doosirühmas.
14. Isasrottide puberteedilähedane kastreerimine peaks toimuma asjakohasel viisil, heakskiidetud anesteetikumide ja aseptilise tehnika kasutamisega. Esimese paari päeva jooksul pärast operatsiooni tuleks manustada valuvai-gisteid, et kõrvaldada operatsioonijärgseid vaevusi. Kastreerimine suurendab katsemeetodi täpsust nõrkade androgeenide ja antiandrogeenide avastamisel, kuna kõrvaldab kompenseerivad sisesekretsioonisüsteemi tagasisidemehhanismid, mis on olemas opereerimata katseloomas ja mis võivad nõrgendada manustatavate androgeenide ja antiandrogeenide mõju, ning kõrvaldab samuti eri isasrottide testosteroonitaseme suured erinevused seerumis. Seega vähendab kastreerimine loomade arvu, mida on vaja endokriinse mõju tuvastamiseks sõeluuringuga.
15. Sõeluuringuga võimaliku androgeense toime leidmiseks manustatakse uuritavat kemikaali iga päev suukaudse sondiga või nahaaluse süstiga kümnel järjestikusel päeval. Uuritavat kemikaali manustatakse vähemalt kahe doosirühma katseloomadele; kõigile ühe rühma loomadele manustatakse ühesuguseid doose. Loomad lahatakse 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Kahe või enama sihtorgani massi statistiliselt oluline suurenemine uuritavat kemikaali saanud rühmades võrreldes kontrollrühmaga, kellele antakse kandeainet, näitab, et uuritav aine on võimaliku androgeense toime suhtes positiivne (vt punkt 60). Sellised androgeenid nagu trenboloon, mida ei ole võimalik 5 α — taandada, avaldab tugevamat mõju LABC-le (*levator ani-bulbocavernosus*) ja GP-le (*glans penis*) kui testosteroonpropionaat, kuid kõigi kudede juures peaks näha olema intensiivsemat kasvu.
16. Võimaliku antiandrogeense aktiivsuse otsimisel sõelkatsetega manustatakse uuritavat kemikaali iga päev suukaudse sondi või naha alla süstimisega kümnel järjestikusel päeval koos testosteroonpropionaadi igapäevase manustamisega (0,2 või 0,4 mg/kg/päevas) nahaluste süstide abil. Valideerimisprogrammiga tehti kindlaks, et võib kasutada kas 0,2 või 0,4 mg/kg/päevas, kuna mõlema doosiga sai avastada antiandrogeene ja sellepärast tuleks katsetes kasutamiseks valida ainult üks nendest doosidest. Erinevaid uuritava kemikaali doose manustatakse vähemalt kolme doosirühma katseloomadele; kõigile ühe rühma loomadele manustatakse ühesuguseid doose. Loomad lahatakse 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Kahe või enama sihtorgani massi statistiliselt oluline vähenemine uuritavat kemikaali ja testosteroonpropionaati saanud rühmades võrreldes kontrollrühmaga, kellele antakse ainult testosteroonpropionaati, näitab, et uuritav aine on võimaliku antiandrogeense toime suhtes positiivne (vt punkt 61).

▼ **M5****MEETODI KIRJELDUS****Liikide ja liinide valimine**

17. Hershbergeri biokatseks on juba alates 1930. aastatest tavaliselt kasutatud rotte. Kuigi bioloogiliselt on võimalik, et roti ja hiire reaktsioon võib olla sarnane, on roti 70-aastase kasutamise põhjal kujunenud rott Hershbergeri biokatse eelistatud loomaliigiks. Lisaks sellele, kuna Hershbergeri biokatse tulemus võib olla pikema, mitut põlvkonda hõlmava uuringu eelkatse, võimaldab see kasutada mõlemas uuringus sama liigi ja liini ning samast allikast pärinevaid loomi.
18. Käesoleva katse-eeskirja kohaselt lubatakse laboril valida katse kasutamiseks sellise liini rott, keda osalevas laboris on varem tavaliselt kasutatud. Katseloomadena võib kasutada tavaliselt laboris peetavate rotiliinide loomi, kuid siiski ei tuleks kasutada liine, mille isasloomad küpsevad oluliselt hiljem kui 42 päeva vanuselt, kuna nende loomade kastreerimine 42. päeval võib takistada suguti pea massi määramist, mida saab teha alles pärast seda, kui eesnahk on eraldunud peenise tüve küljest. Seega ei tuleks kasutada liine, mis pärinevad Fisher 344 rottidest, või teha seda üksnes harvadel juhtudel. Fisher 344 rottidel on seksuaalse küpsemise ajastus teistsugune kui sagedamini kasutatavatel Sprague Dawley või Wistari liini rotid (16). Kui tuleb kasutada sellist liini, tuleks need kastreerida veidi kõrgemas vanuses ja labor peab suutma näidata, et kasutatav liin on tundlik. Labor peaks selgelt põhjendama, miks valiti konkreetse liini rotid. Kui söeluuring võib olla korduva suukaudse doosi, reproduktiivtoksilisuse, arenguhäireid põhjustava toksilisuse või pikaajalise toksilisuse uuringu eelkatse, tuleks kõigis uuringutes eelistatavalt kasutada samast liinist ja samalt tarnijalt saadud loomi.

Pidamis- ja söötmingimused

19. Kogu katse teostus peaks vastama laboriloomade hooldamise kõikidele kohalikele normidele. Siin esitatud loomade hoolduse ja dooside manustamise kirjeldused vastavad miinimumstandarditele ning rangemad kohalikud õigusaktid, nagu Euroopa Parlamendi ja nõukogu 22. septembri 2010. aasta direktiiv 2010/63/EL teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (26), on nende suhtes ülimuslikud. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (ligikaudne vahemik ±3 °C). Suhteline õhuniiskus peaks olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt ei peaks olema üle 70 %, välja arvatud ruumi koristamise ajal. Eesmärgiks peaks olema suhtelise õhuniiskuse hoidmine 50–60 % vahemikus. Valgustus peaks olema kunstlik. Ööpäevas peaks olema 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust.
20. Rühmas pidamine on eelistatav isoleerimisele, arvestades loomade noorust ja asjaolu, et rotid on seltsingulised loomad. Kahe või kolme looma paigutamine puuri võimaldab vältida liigset asustustihedust ja sellega seotud stressi, mis võib mõjutada paljunemise funktsiooniga seotud kudede arengut. Puurid tuleb hoolikalt puhastada võimalikest saasteainetest; puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Sobiva suurusega puuris (ca. 2 000 ruutsentimeetrit) ei ole loomad liiga tihedalt.
21. Iga loom peab olema humaansel viisil eraldi märgistatud (nt kõrvamärk või lipik). Kasutatud märgistamismeetod tuleks kirjeldada.

▼ **M5**

22. Laborisööda ja joogivee tarbimine peaks olema *ad libitum*. Hershbergeri biokatset tegev labor peaks kasutama tavalist sööta, mida tavaliselt kasutatakse kemikaalide katsetamise uuringute puhul. Biokatse valideerimisuurinus ei täheldatud mõju või varieeruvust, mille põhjuseks oleks tulnud pidada sööta. Kasutatud sööt tuleks kirjeldada ja laborisööda proov tuleks säilitada võimaliku tulevase analüüsi jaoks.

Androgeenisõltuvate organite masside kasutatavuse kriteeriumid

23. Valideerimisuuringu ajal ei saadud tõendeid, et kehamassi vähenemine oleks mõjutanud sihtkude (st käesolevas uuringus kaalutavate kudede) massi suurenemist või vähenemist.
24. Valideerimisprogrammis edukalt kasutatud eri liinide hulgas on androgeenisõltuvate organite mass suurema kehamassiga rotuliinide puhul suurem kui väiksema kehamassiga rottidel. Hershbergeri biotesti kehtivuse kriteeriumid ei hõlma seega elundite oodatavat absoluutset massi positiivsetes (doosi)rühmades ja negatiivsetes kontrollrühmades.
25. Kuna koe puhul on variatsioonikordaja (CV) pöördvõrdeline statistilise võimsusega, siis Hershbergeri biokatse kasutatavuse kriteeriumid põhinevad iga koe puhul lubataval maksimaalsel CV väärtusel (tabel 1). CV väärtused tulenevad OECD valideerimisuuringutest. Negatiivse tulemuse korral peaks labor uurima kontrollrühma ja suure doosiga rühma CV-sid ja tegema kindlaks, kas kasutatavuse jaoks lubatava maksimaalse CV kriteerium on ületatud.
26. Uuringut tuleks korrata, kui: 1) kontrollrühma ja suure doosi rühmade kümnest võimalikust eraldi CV-st on kolm või enam suuremad agonisti ja antagonist uuringute jaoks esitatud väärtustest tabelis 1 ning 2) vähemalt kaks sihtkude olid marginaalselt ebaolulised, st p väärtused on vahemikus 0,05–0,10. ⁽¹⁾

Tabel 1

Maksimaalsed lubatavad CVd, mis on kastraatudel määratud paljunemise funktsiooniga seotud sihtkude jaoks OECD valideerimisuurinus ⁽¹⁾

Kude	Antiandrogeensed mõjud	Androgeensed mõjud
Seemnepõiekesed	40 %	40 %
Ventraalne eesnääre	40 %	45 %
Levator ani-bulbocavernosus	20 %	30 %
Cowperi näärmed	35 %	55 %
Glans penis	17 %	22 %

⁽¹⁾ CV künnisväärtus teatava koe jaoks määrati CV väärtuste graafikult, millele olid kantud kõikide valideerimisuuringute konkreetse mudeliga (agonist või antagonist) leitud keskvaartuste CV-d järjestatuna väikseimast suurimani. CV künnisväärtuseks loeti punkt, mille juures CV-väärtuste suurenemised järgmiste kõrgemate CV-de suunas muutusid järsult suuremaks kui mõne eelneva CV vahel — see loeti murdepunktiks. Tuleks märkida, et kuigi selle analüüsiga leiti suhteliselt usaldusväärseid murdepunkte katse antagonistide mudeli puhul, olid agonistide mudeli CV kõverad ühtlasemate suurenemistega väärtuste vahel, mistõttu künnisväärtuse CV leidmine selle meetodiga oli mõnevõrra meelevaldne.

▼ **M5****KATSE KORRALDUS****Õigusnormidele vastavus ja labori valideerimine**

27. Erinevalt uterotroofsest katsest (käesoleva lisa peatükk B.54) ei ole Hersbergeri katse puhul enne katse alustamist vaja tõendada labori pädevust, kuna paralleelselt tehakse positiivset kontrollkatset (testosteroonpropionaat ja flutamiid) ja negatiivset kontrollkatset, mis on katse lahutamatud osad.

Loomade arv ja seisund

28. Igas doosi- ja kontrollrühmas peaks olema vähemalt 6 looma. See kehtib nii androgeense kui ka antiandrogeense katse-eeskirja kohta.

Kastreerimine

29. Pärast loomade saamist peaks olema esialgne kohanemisperiood mitu päeva, et veenduda, et loomad on hea tervise juures ja tunnevad end hästi. Kuna enne 42 päeva vanuseks saamist (PND 42) kastreeritud loomadel ei tarvitse eesnähk eralduda, tuleks loomad kastreerida 42. päeval või hiljem, mitte varem. Loomad kastreeritakse narkoosi all; munandikotti tehakse sisselõige, kõrvaldatakse mõlemad munandid ja munandimanused ning veresooneid ja seemnejuhad ligeeritakse. Kui on kindlaks tehtud, et verejooksu ei ole, tuleks munandikott sulgeda õmbluse või klambritega. Loomadele tuleks esimestel päevadel pärast operatsiooni anda valuvaigistit, et leevendada operatsioonijärgseid ebamugavusi. Kui loomade tarnijalt ostetakse kastreeritud loomad, teatab tarnija loomade vanuse ja seksuaalse küpsuse staadiumi.

Kohanemine pärast kastreerimist

30. Loomadel tuleks lasta jätkata kohanemist laboritingimustega vähemalt 7 päeva pärast kastreerimist, et sihtkoed saaksid taandareneda (nende mass väheneb). Loomi tuleb iga päev jälgida ja kõik haiguse või kehaliste kõrvalkallate märkidega loomad tuleks kõrvaldada. Dooside manustamist uuringu tegemiseks saab alustada kõige varem seega 49. päeval pärast sündimist (PND 49), seda ei tohiks alustada hiljem kui päeval PND 60. Vanus lahkamise ajal ei tohiks olla suurem kui PND 70. Selline paindlikkus lubab laboril oma katseid tõhusalt planeerida.

Kehamassi ja juhuvaliku alusel rühmadesse jagamine

31. Loomade kehamassi erinevused põhjustavad keha kudede massi varieeruvust nii rühma sees kui ka rühmade vahel. Suurem koemasside varieeruvus suurendab variatsioonikordajat (CV) ja vähendab katse statistilist võimsust (mida nimetatakse mõnikord katse tundlikkuseks). Seepärast tuleks kehamassi varieeruvust hoida nii eksperimentaalselt kui ka statistiliselt kontrolli all.
32. Eksperimentaalne kontrolli all hoidmine hõlmab kehamassi varieeruvuse võimalikult väiksena hoidmist nii katserühma piires kui ka rühmade vahel. Kõigepealt tuleks vältida ebatavaliselt väikseid või suuri loomi ja neid ei tuleks võtta uuritavate loomade hulka. Katse alguses ei tohiks loomade kehamassi varieeruvus olla suurem kui $\pm 20\%$ keskmisest kehamassist (nt $175 \text{ g} \pm 35 \text{ g}$ kastreeritud puberteedilähedases vanuses rottide puhul). Teiseks, loomad tuleks jaotada (kontroll- ja doosi)rühmadesse kehamassi varieeruvuse järgi juhuvaliku alusel, nii et iga rühma keskmine kehamass ei oleks statistiliselt erinev muu rühma vastavast näitajast. Kasutatud randomiseerimismeetodit tuleb kirjeldada.

▼ **M5**

33. Kuna kemikaali mürgisus võib vähendada kehamassi doosirühmades, võrreldes kontrollrühmaga, võiks statistilise kaasmuutujana kasutada kehamassi uuritava kemikaali manustamise esimesel päeval, mitte kehamassi lahkamise ajal.

Dooside manustamine

34. Selleks et teha kindlaks, kas uuritaval kemikaalil võib *in vivo* olla androgeenset toimet, piisab tavaliselt kahest doosirühmast ning positiivsest kontrollrühmast ja kandeaine (negatiivsest) kontrollrühmast (vt punkt 43); seepärast eelistatakse sellist katse kava loomade heaoluga seotud põhjustel. Kui eesmärk on saada doosi ja toime vahelise sõltuvuse kõver või ekstrapoleerida toimet madalamatele doosidele, on vaja vähemalt 3 doosirühma. Kui on vaja ka muud teavet peale androgeense toime kindlakstegemise (näiteks hinnata mõju tugevust), tuleks kaaluda teistsugust dooside manustamise režiimi. Antiandrogeense toime uurimiseks manustatakse uuritavat kemikaali koos võrdluseks kasutatava androgeeniagonistiga. Tuleks kasutada vähemalt kolme uuritava kemikaali erineva doosiga katserühma (doosirühmad) ning positiivse kontrolli ja negatiivse kontrolli rühma (vt punkt 44). Kontrollrühma loomi tuleks kohelda samamoodi kui doosirühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet, tuleb kontrollrühmale manustada kandeainet suurimas doosirühmade puhul kasutatud mahus.

35. Kõikide doosimäärade valimisel tuleks arvesse võtta kõiki uuritava kemikaali või sellega seotud materjalide toksilisust käsitlevaid ja (toksiko-)kineetilisi andmeid. Suurima doosi puhul tuleb kõigepealt arvesse võtta LD₅₀ väärtust ja/või teavet ägeda mürgisuse kohta, et vältida loomade surma, suuri kannatusi või ebamugavusi (17, 18, 19, 20), ja teiseks olemasolevat teavet dooside kohta, mida on kasutatud subkroonilise ja kroonilise toksilisuse uuringutes. Üldiselt ei tohiks suurim doos põhjustada kehamassi vähenemist katse lõpuks mitte rohkem kui 10 % kontrollrühma loomade massist. Suurim doos peaks olema kas: 1) suurim doos, mis tagab loomade ellujäämise ja mis ei põhjusta erilist mürgistust või kannatusi loomadele pärast manustamist 10 järjestikusel päeval doosis kuni 1 000 mg/kg/päevas (vt punkt 36) või 2) doos, mis põhjustab (anti)androgeenset toimet, olenevalt sellest, kumb on väiksem. Kuna see on sõelkatse, siis võib kasutada suuri dooside intervalle (näiteks 0,5 logaritmilist ühikut, mis vastab dooside 3,2-kordsele erinevusele, või isegi 1 logaritmiline ühik). Kui vajalikke andmeid ei ole, võib kasutatavate dooside leidmise hõlbustamiseks teha doosipiirkonna määramise katse (vt punkt 37).

Piirdoosi tase

36. Kui katse piirdoosiga 1 000 mg/kg/päevas ja väiksema doosiga vastavalt käesolevas eeskirjas kirjeldatud korrale ei tekita statistiliselt olulist muutust reproduktiivorganite massis, võib täiendavaid doositasemeid pidada mittevajalikuks. Sellist piirdoosi väärtust kasutatakse alati, välja arvatud sellised juhud, kui inimese kokkupuute andmed viitavad vajadusele kasutada kõrgemat doositaset.

Vahemiku leidmise kaalutlused

37. Vajaduse korral võib väikse arvu loomadega teha esialgse uuringu doosivahemiku leidmiseks, et valida sobivad doosirühmad (kasutades ägeda mürgisuse tuvastamise katseid (käesoleva lisa peatükid B.1b, B.1c (27)), OECD katse-eeskiri 425 (19)). Hershbergeri biokatse puhul on eesmärk valida doosid, mis tagaksid loomade ellujäämise, ei oleks oluliselt mürgised ega põhjustaks loomadele erilist stressi pärast uuritava kemikaali manustamist kümnel järjestikusel päeval piirdoosiga kuni 1 000 mg/kg/päevas, nagu

▼ **M5**

on märgitud punktides 35 ja 36. Selleks võib kasutada OECD juhenddokumenti (17), milles on määratletud mürgistusele või looma stressile osutavad kliinilised tunnused. Kui see on doosivahemiku leidmise uuringus teostatav, võib koed pärast 10-päevast kemikaali manustamist välja lõigata ja kaaluda ligikaudu 24 tundi pärast viimase doosi manustamist. Neid andmeid võib seejärel kasutada põhiuurimuses kasutatavate dooside valimise hõlbustamiseks.

Võrdluskemikaalid ja kandeaine

38. Võrdluseks kasutatav androgeeniagonist peaks olema testosteroonpropionaat (TP), CASi nr 57-82-5. Võrdlus-TP doos võib olla kas 0,2 või 0,4 mg/kg/päevas. Võrdluseks kasutatav androgeeniantagonist peaks olema flutamiid (FT), CASi nr 1311-84-7. Võrdlus-FT doos peaks olema 3 mg/kg/päevas ja FT tuleks manustada koos võrdlus-TP doosiga.
39. Soovitav on võimaluse korral kõigepealt kaaluda manustamist vesilahusena või suspensioonina vees. Kuid kuna paljud androgeensed ligandid või nende metaboolsed eellased on hüdrofoobsed, kasutatakse kõige sagedamini lahust või suspensiooni õlis (nt maisi-, maapähkli-, seesami- või oliiviõli). Uuritava kemikaali võib lahustada minimaalses koguses 95 % etanoolis või muus sobivas lahustis ja lahjendada lõpliku töökonsentratsioonini katses kasutatavas kandeaines. Lahusti toksilised omadused peaksid olema teada ning need tuleks välja selgitada eraldi kontrollrühmaga, kellele manustatakse üksnes lahustit. Kui uuritavat kemikaali peetakse stabiilseks, võib selle lahustamise hõlbustamiseks kasutada ettevaatlikku soojendamist ja tugevat segamist. Tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines. Kui uuritav kemikaal on stabiilne kogu uuringu jooksul, võib valmistada uuritava kemikaali lähtealivoodi ja teha sellest iga päev vajalikud lahjendused, olles hoolikas, et vältida proovide saastumist või rikkumist.

Dooside manustamine

40. TP-d tuleks manustada nahaaluse süstiga ja FT-d suukaudse sondiga.
41. Uuritavat kemikaali manustatakse suukaudse sondiga või naha alla tehtava süstiga. Manustamistee valimisel tuleb arvestada loomade heaoluga seotud kaalutlusi ning uuritava kemikaali füüsikalisi ja keemilisi omadusi. Lisaks tuleb arvestada toksikoloogilisi aspekte, nagu kokkupuuteviisi asjakohasus inimese kemikaaliga kokkupuute seisukohast (nt suukaudne sond vastab allaneelamisele, nahaalused süstid — sissehingamisele või imendumisele naha kaudu), ning olemasolevaid toksikoloogilist teavet ja andmeid metabolismi ja kineetika kohta (nt vajadus vältida presüsteemset metabolismi, suurem tõhusus teatava manustamistee korral), enne kui süstimise teel saadud positiivse tulemuse põhjal algatatakse ulatuslik pikaajaline uuring.
42. Loomadele tuleks doose manustada samal viisil ja sama ajakava kohaselt 10 järjestikusel päeval umbes 24-tunniste vaheaegadega. Doosi suurust tuleks kohandada iga päev, arvestades igapäevaseid kehamassi määramise andmeid. Igal doosi manustamise päeval tuleks kirja panna doosi maht ja manustamise kellaaeg. Tuleb jälgida, et ei ületataks maksimaalset doosi, mida on kirjeldatud punktis 35, et andmeid oleks võimalik mõistlikult tõlgendada. Selles suhtes tuleks hoolikalt hinnata kehamassi vähenemist, kliinilisi tunnuseid ja muid tähelepanekuid. Tuleks kasutada suukaudset sondi, maosondi või sobivat intubatsioonikanüüli. Vedeliku suurim kogus,

▼ **M5**

mida saab ühel korral manustada, sõltub katseloomade suurusest. Tuleb järgida kohalikke loomakaitse eeskirju, kuid lahuse maht ei tohiks ületada 5 ml kehamassi kg kohta, välja arvatud vesilahuse puhul, kus võib kasutada mahtu kuni 10 ml kehamassi kg kohta. Nahaaluse süstiga manustamisel tuleks doose manustada selja abaluu- või nimmepiirkonda steriilse nõelaga (kaliiber näiteks 23 või 25) ja tuberkuliinisüstlaga. Soovi korral võib süstimiskoha puhtaks raseerida. Registreerida tuleks lahuse kaod, süstekohast väljajumbumine või doosi mittetäielik manustamine. Päevas rotile süstitav vedelikukogus ei tohiks ületada 0,5 ml kehamassi kg kohta.

Androgeeniagonistide katsete tegemise meetodid

43. Androgeeniagonistide katsetes on kandeaine negatiivne kontroll ja TP-d saav rühm on positiivse kontrolli rühm. Androgeeniagonistide omast bioloogilist toimet kontrollitakse uuritava kemikaali manustamisega katserühmadele valitud doosis 10 järjestikuse päeva jooksul. Kemikaali saanud katserühma loomade paljunemise funktsiooniga seotud viie koe massi võrreldakse kandainet saanud loomade vastavate kudede massiga, et leida statistiliselt oluline massi suurenemine.

Androgeeniantagonistide ja 5 α -reduktaasi inhibiitorite katsete tegemise meetodid

44. Androgeeniantagonistide ja 5 α -reduktaasi inhibiitorite katsetes on TP-d saav rühm negatiivne kontroll ja rühm, mille loomadele manustatakse korraga TP-d ja FT-d, on positiivne kontroll. Androgeeniantagonistide ja 5 α -reduktaasi inhibiitoritega seotud bioloogilist toimet kontrollitakse TP võrdlusdoosi ja uuritava kemikaali manustamisega 10 järjestikuse päeva jooksul. TP-d ja kemikaali saanud katserühma loomade paljunemise funktsiooniga seotud viie koe massi võrreldakse ainult TP-d saanud loomade vastavate kudede massiga, et leida statistiliselt oluline massi vähenemine.

VAATLUSED**Kliinilised vaatlused**

45. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas ja sagedamini, kui ilmneb toksilisuse märke. Vaatlusi oleks soovitatav teha iga päev samal ajal, võttes arvesse oodatava maksimaalse mõju avaldumise aega pärast doosi manustamist. Kõigi loomade puhul tuleks jälgida suremust, haigestumust ja selliseid kliinilisi tunnuseid nagu käitumise, naha, karvkatte, silmade ja limaskestade muutused, eritiste esinemine, autonoomse närvisüsteemi aktiivsuse muutused (nt pisaravool, turris karv, pupilli suurus, muutunud hingamine).
46. Surmuna leitud loomad tuleks kõrvaldada ning hävitada ilma täiendava andmete analüüsita. Iga looma surm enne lahangu tuleks kanda katseprotokollis koos surma võimalike põhjustega. Kõik suremas olevad loomad tuleks humanseelt surmata. Iga suremas olnud ja hiljem eutanaasia teel surmatud loom tuleks kanda katseprotokollis ja esitada haiguse võimalikud põhjused.

▼ M5**Kehamass ja sööda tarbimine**

47. Kõiki loomi tuleks kaaluda iga päev täpsusega 0,1 g, alustades hetkest enne esimese doosi manustamist, st kui loomad on juba jagatud rühmadesse. Lisaks võib mõõta dooside manustamise aja jooksul igas puuris tarbitud sööda koguse söötmissaadmete kaalumise järgi. Sööda tarbimise tulemused väljendatakse grammides ühe roti kohta päevas.

Lahkamine ning kudede ja organite massi mõõtmine

48. Ligikaudu 24 tundi pärast uuritava kemikaali viimase doosi manustamist tuleks rotid humaanselt surmata ja lasta verest tühjaks joosta vastavalt katset tegeva labori tavalisele korrale ning teha lahkamine. Humaanse surmamise meetod tuleks esitada katseprotokollis.

49. Ideaaljuhul tuleks kõikide rühmade liikmete lahkamine teha juhuslikus järjekorras, et vältida kõige alguses või kõige lõpus ühe või teise rühma liikmete lahkamist, mis võiks andmeid mõjutada. Kõik lahkamise tähelepanekud, nagu patoloogilised muutused või nähtavad kahjustused, tuleks üles märkida ja esitada protokollis.

50. Viis androgeenisõltuvat kude (VP, SV, LABC, COW, GP) tuleks kaaluda. Need koed tuleks välja lõigata, hoolikalt vabastada liigsetest nende külge kinnitunud kudedest ja rasvast ning määrata nende värske (fikseerimata) mass. Iga kude tuleks käidelda eriti hoolikalt, et vältida vedelike kaotust ja kuivamist, mis võib põhjustada suuri vigu ja varieeruvust, kuna väheneb registreeritav mass. Mõned koed võivad olla väga väikesed või raskesti välja lõigatavad ja see tekitab varieeruvust. Seepärast on oluline, et paljunemise funktsiooniga seotud kudede eraldamist sooritav isik tunneks nende kudede eraldamise tavalist korda. Standardse töökorra (SOP) käsiraamatu saab OECD-lt (21). Uuringu tulemuste võimalikku varieeruvust saab vähendada SOP juhendialase hoolika koolitusega. Ideaaljuhul peaks teatava konkreetse koe eraldamisi tegema sama isik, et vähendada isikutevahelisi erinevusi kudede töötlemisel. Kui see ei ole võimalik, peaks lahkamine olema korraldatud nii, et iga lahkaja eraldab teatavat kude kõigi katserühmade loomadelt, mitte nii, et üks isik eraldab kõik koed kontrollrühma loomadelt ja teine isik doosirühmade loomadelt. Iga paljunemise funktsiooniga kude tuleks ilma kuivaks pühkimata kaaluda 0,1 mg täpsusega ja iga looma kudede massid tuleb registreerida.

51. Mõned koed võivad olla väga väikesed või raskesti välja lõigatavad ja see tekitab varieeruvust. Varasema tööga on leitud variatsioonikordajate (CV) vahemik, mis näib olevat erinev ja näib sõltuvat labori pädevuse tasemest. Mõnel juhul on täheldatud kudede, nagu VP ja COW, absoluutmasside suuri erinevusi samas konkreetses laboris.

52. Soovi korral võib määrata ka maksa massi, mõlema neeru massi (koos) ja mõlemate neerupealiste massi (koos). Koed tuleks ka sel puhul vabastada nendega ühendatud sidekirmetest ja rasvast. Maks tuleks kaaluda täpsusega 0,1 g, mõlemad neerud ja mõlemad neerupealised — täpsusega 0,1 mg ning need andmed registreerida. Maksa, neerusid ja neerupealisi ei mõjuta mitte üksnes androgeenid; need elundid annavad kasulikku teavet ka süsteemse mürgisuse kohta.

▼ M5

53. Soovi korral võib mõõta luteiniseeriva hormooni (LH), folliikuleid stimuleeriva hormooni (FSH) ja testosterooni (T) sisalduse seerumis. Testosteroonisisaldust seerumis on kasulik määrata siis, kui uuritav kemikaal põhjustab testosterooni metabolismi maksas ja vähendab seerumi testosteroonisisaldust. Kui selliseid T andmeid ei ole, võib näida, et mõju avaldub antiandrogeense mehhanismi kaudu. LH tase annab teavet antiandrogeeni omaduse kohta mitte ainult vähendada elundite massi, vaid mõjutada ka hüpotalamuse-ajuripatsi funktsioone, mis pikaajalises katses võib tekitada munandikasvajaid. FSH on oluline hormoon spermatogeneesi jaoks. Võib määrata ka seerumi T4 ja T3 sisalduse; see võib anda kasulikku lisateavet kemikaali võime kohta häirida kilpnäärme homöostaasi. Kui tehakse hormoonide mõõtmisi, tuleks rotid enne lahkamist tuimastada ja võtta neilt veri südame punktsiooniga; narkoosimeetod tuleks valida hoolikalt, et mitte mõjutada hormoonitaseme mõõtmisi. Seerumi valmistamise meetod, radioimmuunanalüüsi- või muude mõõtmiskomplektide päritolu ja tulemused tuleks registreerida. LH ja T sisaldus esitatakse ng-des seerumi ml kohta.
54. Kudede eraldamisel tuleb tugineda üksikasjalikele fotodega lahkamisjuhenditele, mis on avaldatud valideerimisprogrammi osana kui lisamaterjal (21). Korea toidu- ja ravimiameti veebisaidil on kättesaadav ka lahkamist käsitlev video (22).
- Looma keha pannakse lauale kõhuga ülespoole ja tehakse kindlaks, kas suguti eesnähk on eraldunud suguti peast. Kui see on nii, tõmmatakse eesnähk tagasi, eemaldatakse suguti pea ja kaalutakse see 0,1 mg täpsusega; mass registreeritakse.
 - Avatakse kõhunähk ja kõhuõõne sein, paljastatakse siseelundid. Kui tuleb määrata soovi korral määratavate elundite mass, eemaldatakse ja kaalutakse maks täpsusega 0,1 g, eemaldatakse magu ja soolestik, eemaldatakse ja kaalutakse neerud (koos) ja neerupealised (koos) täpsusega 0,1 mg. Sellise lahkamisega paljastatakse kusepõis ja jõutakse isaslooma paljunemiskomplektide seotud kudede eraldamiseni.
 - Ventraalse eesnäärme eraldamiseks eraldatakse kusepõis kõhulihaste kihist, milleks lõigatakse läbi sidekude piki keskjoont. Kusepõis nihutatakse ettepoole seemnepõiekeste suunas, millega paljastatakse ventraalse eesnäärme (*ventral prostate*, VP) vasak ja parem sagar (mida katab rasvakiht). Rasv pühitakse ettevaatlikult VP vasakult ja paremalt sagaralt. VP parem sagar tõstetakse kusiitilt ja eraldatakse sagar kusiitist. Hoides VP paremat sagarat, tõstetakse VP vasak sagar kusiitilt ja eraldatakse; kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja registreeritakse mass.
 - Seemnepõiekeste ja koagulatsiooninäärmete (*seminal vesicles plus coagulating glands*, SVCG) eraldamiseks lükatakse põis saba poole, millega paljastatakse seemnejuhad ning SVCG parem ja vasak sagar. Vedeliku lekke ärahoidmiseks pannakse verejooksu sulgemise klamber SVCG lähtekohale, kus seemnejuha ühineb kusiitiga. SVCGd eraldatakse ettevaatlikult, hoides klambrit oma kohal, lõigatakse ära rasv ja manused, pannakse teadaoleva massiga kaalumiskõlbe, eemaldatakse klamber, kaalutakse 0,1 mg täpsusega ja registreeritakse mass.

▼ **M5**

- Selleks et eraldada *levator ani* ja *bulbocavernosus* (LABC) lihased, paljastatakse suguti alus ja lihased. LA lihased ümbritsevad käärsoolt, samal ajal kui eesmised LA ja BC lihased on kinnitunud suguti sibulale. Perianaalse piirkonna nahk ja manused, mis ulatuvad peenise lähteko-
hast kuni päraku eesmise otsani, eemaldatakse. BC lihased eraldatakse järk-järgult suguti sibulast ja kudedest. Käärsool lõigatakse pooleks ja nüüd saab eraldada ja kõrvaldada kogu LABC. LABC tuleks puhastada rasvast ja manustest, kaaluda 0,1 mg täpsusega ja registreerida mass.
 - Kui LABC on eemaldatud, tulevad nähtavale ümmargused Cowperi või bulbouretraalnäärmed (COW) suguti sibula lähtekoha juures, veidi selja poole. Lõigata tuleb hoolikalt, et vältida õhukese kesta läbitorkamist ja vedeliku väljavoolu. COW (koos) kaalutakse täpsusega 0,1 mg ja registreeritakse mass.
 - Lisaks, kui lahkamise või kudede eraldamise ajal voolas mõnest näärmest vedelikku välja, tuleks see registreerida.
55. Kui ühe kemikaali hindamiseks on vaja lahata rohkem loomi, kui ühe päevaga on võimalik lahata, võib uuringu alguse jaotada kahele järjestikusele päevale, millega ka lahkamine ja sellega seotud tööd jaotuvad kahele päevale. Kui töö jaotatakse niimoodi järkudesse, tuleks ühel päeval kasutada pooled iga doosirühma loomadest.
56. Kehad tuleks pärast lahangu kõrvaldada sobival viisil.

PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmed**

57. Andmed tuleks esitada eraldi iga looma kohta (kehamass, paljunemisfunktsiooniga seotud kudede mass, soovi korral tehtud täiendavad mõõtmised, muud toimed ja tähelepanekud) ja iga loomarühma kohta (arvutatakse kõikide mõõtmistulemuste keskvärtused ja standardhälbed). Andmed tuleb koondada tabelisse. Tuleks esitada loomade arv katse alguses, katse käigus surnult või mürgistuse tunnustega leitud loomade arv, täheldatud toksilisuse tunnuste kirjeldus, sealhulgas tunnuste ilmnemise aeg, tunnuste kestus ja raskus.
58. Lõpp-protokollis tuleks esitada järgmine.

Uurimislabor:

- nimi ja asukoht;
- uuringu juht, muud töötajad ja nende kohustused uuringu käigus;
- uuringu alguse ja lõpetamise kuupäev, st uuritava kemikaali manustamise esimene päev ja viimane lahkamispäev.

Uuritav kemikaal:

- allikas, partii number, nimetus, puhtus, tarnija täielik aadress ja uuritava kemikaali täielik iseloomustus;
- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;
- lahjenduste valmistamise meetod, sagedus ja lahuste hoiutingimused;
- kõik andmed, mis on saadud püsivuse kohta;
- kõik manustamislahuste või -suspensioonide analüüsid.

▼ **M5***Kandeaine:*

- kandeaine iseloomustus (nimetus, tarnija ja partii nr);
- kandeaine valimise põhjendus (kui kandeaine on muu kui vesi).

Katseloomad ja nende pidamise tingimused:

- kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;
- päritolu või tarnija, kaasa arvatud täielik aadress;
- tarnitud loomade arv ja vanus;
- pidamistingimused (temperatuur, valgustus jne);
- sööt (nimetus, tüüp, tarnija, partii number, koostis ja, kui on teada, fütoöstrogeenide sisaldus);
- allapanu (nimetus, tüüp, tarnija ja koostis);
- puuridesse paigutamise tingimused ja loomade arv puuris.

Katse tingimused:

- vanus kastreerimise ajal ja kohanemise kestus pärast kastreerimist;
- iga looma mass katse alguses (täpsusega 0,1 g);
- kasutatud randomiseerimismeetod ning kandeaine rühma, võrdlusrühma, uuritava kemikaali rühmadesse ja puuridesse määramise andmed;
- iga rühma loomade kehamassi keskvärtus ja standardhälve igal kaalumispäeval kogu uuringu kestel;
- doosi valimise põhjendused;
- uuritava kemikaali manustamise tee ja kokkupuuteviisi valiku põhjendus;
- antiandrogeensuse katse tegemisel TP manustamine (doos ja maht);
- uuritava kemikaali manustamine (doos ja maht),
- manustamise aeg;
- lahkamise kord, sealhulgas veretustamise vahendid ja kasutatud anesteetikumid;
- seerumianalüüside tegemise korral tuleks esitada meetodi üksikasjad. Näiteks, kui kasutatakse radioimmuunanalüüsi (RIA), tuleks esitada järgmine: RIA tegemise kord, RIA komplektide tootja, RIA komplektide aegumise kuupäev, sädearvestuse kord ja standardimine.

Tulemused

- Igapäevased tähelepanekud iga looma kohta dooside manustamise ajal, sealhulgas:
 - kehamass (täpsusega 0,1 g);
 - kliinilised tunnused (kui neid esineb);
 - kõik andmed ja tähelepanekud sööda tarbimise kohta.
- Lahkamise ajal tehtud tähelepanekud iga looma kohta, sealhulgas:

▼ **M5**

- lahkamise kuupäev;
- doosirühm;
- looma identifitseerimisnumber;
- lahkaja;
- lahangu ja kudede eraldamise kellaaeg;
- looma vanus;
- lõplik kehamass lahkamise ajal; märkida iga statistiliselt oluline suurenemine või vähenemine;
- loomade veretustamise ja lahkamise järjekord;
- viie androgeenisõltuva sihtkoe mass;
- ventraalne eesnääre (täpsusega 0,1 mg);
- seemnepõiekesed ja koagulatsiooninäärmed, koos vedelikuga (koos, täpsusega 0,1 mg);
- *levator ani* ja *bulbocavernosus* lihaste kompleks (täpsusega 0,1 mg);
- Cowperi näärmed (märgkaal, koos, täpsusega 0,1 mg);
- peenise pea (märgkaal täpsusega 0,1 mg);
- soovi korral määratavate kudede kaal, kui määrati:
- maks (täpsusega 0,1 g);
- neerud (koos, täpsusega 0,1 mg);
- neerupealised (koos, täpsusega 0,1 mg);
- Üldised märkused ja kommentaarid
- Seerumihormoonide analüüsid, kui need tehti:
 - seerumi luteiniseeriv hormoon (soovi korral; nanogrammi seerumi ml-s) ja
 - seerumi testosteroon (soovi korral; nanogrammi seerumi ml-s).
- Üldised märkused ja kommentaarid

Andmete kokkuvõte

Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina, milles näidatakse valimi suurus iga rühma puhul, keskväärts ja selle standardviga või standardhälve. Tabelites tuleks esitada surmajärgne kehamass, kehamassi muutus dooside manustamise algusest kuni lahkamiseni, paljunemisfunktsiooniga seotud kudede mass ja soovi korral määratud muude elundite mass.

*Tulemuste arutelu***Tulemuste analüüs**

59. Lahkamise ajal määratud kehamassi ja organite massi tuleks statistiliselt analüüsida ja leida näitajad nagu dispersiooni homogeensus, mille jaoks on andmeid vaja sobivalt teisendada. Doosirühmi tuleks võrrelda kontrollrühmaga, kasutades selliseid meetodeid nagu ANOVA, millele järgnevad paariviisilised võrdlused (nt Dunnetti ühepoolne test) ja statistilise erinevuse kriteerium, näiteks $p \leq 0,05$. Tuleb kindlaks teha rühmad, milles on saavutatud statistiline olulisus. Elundite suhtelisi masse kehamassi suhtes tuleks siiski vältida, kuna selline andmetöötlus tugineb väärtustele statistilistele eeldustele.

▼ M5

60. Androgeeniagonismi puhul tuleks kontrollrühmale manustada ainult kandeainet. Uuritava kemikaali toimimisviisi omadused võivad põhjustada eri kudedel suhteliselt erinevat toimet; näiteks trenboloon, mida ei saa 5 α -taandada, avaldab tugevamat mõju LABC-le ja GP-le kui TP. Statistiliselt olulist ($p \leq 0,05$) massi suurenemist viiest androgeenisõltuvast sihtkoest (VP, LABC, GP, CG ja SVCG) vähemalt kahe puhul tuleks lugeda androgeeniagonisti tuvastamise mõttes positiivseks tulemuseks ja kõigi sihtkudedele puhul peaks olema näha vähemalt mingisugust kasvu. Kõikide isassuguorganite kudede reageerimise kombineeritud hindamiseks võib kasutada mitmest korrelatsioonanalüüsi. See võib tõsta analüüsi kvaliteeti, eelkõige juhtudel, kui ainult ühe koe reaktsioon on statistiliselt oluline.
61. Androgeeniantagonismi puhul tuleks kontrollrühmale manustada ainult võrdlusandrogeeni (ainult testosteroonpropionaati). Uuritava kemikaali toimimisviisi omadused võivad põhjustada eri kudede suhteliselt erinevat reageerimist; näiteks 5 α -reduktaasi inhibiitorid, nagu finasteriid, mõjutavad tugevamini ventraalset eesnääret kui muid kudesid, võrreldes tugevate androgeenireseptori antagonistidega nagu flutamiid. Statistiliselt olulist ($p \leq 0,05$) massi vähenemist viiest androgeenisõltuvast sihtkoest (VP, LABC, GP, CG ja SVCG) vähemalt kahe puhul, võrreldes ainuüksi TP-d saanud kontrollrühmaga, tuleks lugeda androgeeniantagonisti tuvastamise mõttes positiivseks tulemuseks ja kõigi sihtkudedele puhul peaks olema näha vähemalt mingil määral vähenenud kasvu. Kõikide isassuguorganite kudede reageerimise kombineeritud hindamiseks võib kasutada mitmest korrelatsioonanalüüsi. See võib tõsta analüüsi kvaliteeti, eelkõige juhtudel, kui ainult ühe koe reaktsioon on statistiliselt oluline.
62. Andmed tuleks esitada kokkuvõtliku tabelina: keskvärtus, keskvärtuse standardviga (sobib ka standardhälve) ja iga rühma valimi suurus. Samuti tuleks lisada üksikandmete tabelid. Tuleks uurida kontrollrühma konkreetseid väärtusi, keskvärtust, keskvärtuse viga (standardhälvet) ja variatsioonikoefitsienti (CV), et teha kindlaks, kas need vastavad varasemate väärtustega kooskõla kriteeriumidele. CV väärtused, mis ületavad tabelis 1 (vt punktid 25 ja 26) esitatud CV väärtusi iga organi massi puhul, peaksid näitama, kas andmete lugemisel või registreerimisel on tehtud vigu või kas labor ei ole veel saavutanud androgeenisõltuvate kudede väljalõikamiseks vajalikku meisterlikkust ja vaja oleks täiendavat koolitust või harjutamist. Üldiselt on CV-d (saadakse standardhälbe jagamisel organi massi keskvärtusega) eri laborite ja eri uuringute tulemuste võrdlemisel korratavad. Esitatud andmed peaksid hõlmama vähemalt järgmist: ventraalse eesnäärme, seemnepõiekeste, *levator ani* ja *bulbocavernosus* lihaste, Cowperi näärmete, suguti pea, maksa ja keha mass ning kehamassi muutus dooside manustamise algusest kuni lahkamiseni. Võib esitada ka parandatud andmed, millesse on kovariatsiooni abil tehtud kehamassi muutumist arvestavad parandid, kuid see ei tohiks asendada korrigeerimata andmete esitamist. Lisaks sellele, kui eesnaha eraldumist (*preputial separation*, PPS) mõnes rühmas ei esine, tuleks registreerida PPS ja võrrelda seda statistiliselt olukorraga kontrollrühmas, kasutades Fisherit taset testi.

▼M5

63. Arvutisse sisestatud andmete kontrollimisel võrdluses originaalandmete lehtedega tuleb hoolikalt uurida organite kaalu väärtusi, mis ei ole bioloogiliselt usutavad või erinevad rohkem kui kolm standardhälvet vastava katserühma keskvaartusest; sellised andmed tuleb võib-olla välja jätta kui tõenäolised registreerimisvead.
64. Sageli on uuringu tulemuste võrdlemine OECD CV väärtustega (tabel 1) tõlgendamise oluline etapp, mis näitab uuringu tulemuste kehtivust. Laboris tuleks säilitada võrdlusrühmade kohta kogutud varasemaid andmeid. Samuti tuleks laboris säilitada andmed positiivsete võrdluskemikaalide nagu TP ja FT toime kohta. Laborid võivad perioodiliselt testida ka teadaolevalt nõrkade androgeeniagonistide ja -antagonistide toimet ning säilitada need andmed. Neid andmeid võib võrrelda kättesaadavate OECD andmetega selle kontrollimiseks, et labori meetodid annavad piisava statistilise täpsuse ja võimsuse.

▼ **M5***1. liide***MÕISTED**

Androgeenne – termin, millega kirjeldatakse positiivset mõju androgeenisõltuvate kudede kasvule.

Antiandrogeenne – kemikaali võime alla suruda testosteroonpropionaadi toimet imetajate organismile.

Doos – manustatav uuritava kemikaali kogus. Hershbergeri biokatse puhul väljendatakse doosi uuritava kemikaali massina katselooma kehamassi ühiku kohta päevas (näiteks mg kehamassi kg kohta päevas).

Doseerimine – üldmõiste, mis hõlmab doosi, dooside manustamise sagedust ja kestust.

Kemikaal – aine või segu.

Spetsiifilisus – katsemeetodi võime õigesti kindlaks määrata kemikaale, millel ei ole katsega kontrollitavat omadust.

Suremas olev – termin, millega kirjeldatakse surmaeelses seisundis looma.

Sünnijärgne päev X – X. elupäev pärast sünnikuupäeva.

Sünnikuupäev – sünnijärgne päev 0 (PND 0).

Tundlikkus – katsemeetodi võime õigesti kindlaks määrata kemikaale, millel on katsega kontrollitav omadus.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Valideerimine – teaduslik menetlus, mille eesmärk on iseloomustada katsemeetodi läbiviimise nõudeid ning tõendada meetodi usaldusväärsust ja asjakohasust konkreetse eesmärgi saavutamiseks.

2. liide

Märkus: dokumendi on koostanud juhenddokumentide programmi sekretariaat vastavalt kokkuleppele, mis saavutati EDTA töörühma 6. koosolekul

Sisesekreetsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik

<p>Tase 1 Sortimine ja prioriteedi omistamine olemasoleva teabe põhjal</p>	<ul style="list-style-type: none"> — füüsikalised ja keemilised omadused, nt molekulmass, reaktsioonivõime, lenduvus, biolagunevus — inimese ja keskkonna kokkupuude, nt tootmisaht, heide keskkonda, kasutusviisid — ohud, nt olemasolevad toksikoloogiaandmed 	
<p>Tase 2 <i>In vitro</i> katsed, mis annavad andmeid mehhanismi kohta</p>	<ul style="list-style-type: none"> — ÖR, AR, TR retseptorile sidumise afiinsus — Transkriptsiooni aktiveerimine — Aromataas ja steroidogeneesi <i>in vitro</i> — Aritüülsüivesinike retseptori äratundmine/sidumine — kvantit. strukt.-aktiivsuse sõltuvused (QSAR) 	<ul style="list-style-type: none"> — Suure jõudlusega sõeluuringud — Kilpnäärmefunktsioon — Kala hepatotsüütide vitellogeniini (VTG) katse — Muud (vastavalt vajadusele)
<p>Tase 3 <i>In vivo</i> assays katsed, mis annavad andmeid ühe hormooni kohta Mehhanismid ja toimed</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Uterotroofne katse (östrogeenid) — Hershbergeri katse (androgeenid) — Hormooni retseptorisõltumatu toime — Muud (nt kilpnääre) 	<ul style="list-style-type: none"> — Kala VTG (vitellogeniin) katse (östrogeenid)
<p>Tase 4 <i>In vivo</i> assays katsed, mis annavad andmeid mitme hormooni kohta Mehhanismid ja toimed</p>	<ul style="list-style-type: none"> — Tõhustatud OECD 407 (näitajad põhinevad endokriinmehhanismidel) — Isas- ja emasloomade puberteedikatsed — Täiskasvanud opereerimata isasloomade katse 	<ul style="list-style-type: none"> — Kala sugunäärmete histopatoloogia katse — Kullese metamorfoosi katse
<p>Tase 5 <i>In vivo</i> katsed, mis annavad andmeid endokriinse jm mehhanismi põhjustatud toime kohta</p>	<ul style="list-style-type: none"> — 1-põlvkonna-katse (tõhustatud TG415)¹ — 2-põlvkonna-katse (tõhustatud TG416)¹ — reproduktiivsõelumiskatse (tõhustatud TG421)¹ — kombineeritud 28 päeva / reproduktiivsõelumise katse (tõhustatud TG422)¹ 	<ul style="list-style-type: none"> — Osalise ja täiseluringi katsed kalade, lindude, kahepaiksete ja selgrootutega (areng ja paljunemine)

¹ VMG mamm kaalub võimalikke tõhustamisi

VMG mamm: imetajatega tehtavate katsete valideerimist ja hindamist juhtiv rühm

▼ **M5****MÄRKUSED RAAMISTIKU JUURDE**

Märkus 1: kõigile tasemetele on võimalik siseneda ja kõigilt tasemetelt on võimalik väljuda; see oleneb sellest, millist teavet on vaja saada ohtude ja riskide hindamiseks.

Märkus 2: tasemel 5 peaks ökotoksikoloogia hõlmama näitajaid, mis näitavad kahjuliku mõju mehhanisme ja võimalikku kahju elanikkonna jaoks.

Märkus 3: kui mitme näitaja kohta tulemusi andev katsemudel hõlmab näitajaid, mida määratakse ühe näitaja kohta tulemusi andva katsega, peaks nimetatud mudel asendama ühe näitaja kohta tulemusi andva katsed.

Märkus 4: iga kemikaali tuleks eraldi hinnata, võttes arvesse kogu olemasolevat teavet ja pidades silmas raamistiku tasemete funktsiooni.

Märkus 5: praegust raamistikku ei tuleks käsitleda kõike hõlmavana. Tasemetel 3, 4 ja 5 hõlmab raamistik katseid, mis on juba kättesaadavad või valideerimine on käimas. Viimast asjaolu arvestades on need ajutiselt lisatud. Kui need on välja töötatud ja valideeritud, saab need ametlikult lisada raamistikku.

Märkus 6: raamistikust ei tohiks niimoodi aru saada, et tasemel 5 on üksnes lõplikud katsed. Arvestatakse, et osutatud tasemel olevad katsed aitavad kaasa üldisele ohtude ja riskide hindamisele.

KIRJANDUS

- 1) OECD (1998). Report of the First Meeting of the OECD Endocrine Disrupter Testing and Assessment (EDTA) Task Force, 10th-11th March 1998, ENV/MC/CHEM/RA(98)5.
- 2) Dorfman RI (1962). Standard methods adopted by official organization. Academic Press, NY.
- 3) Gray LE Jr, Furr J and Ostby JS (2005). Hershberger assay to investigate the effects of endocrine disrupting compounds with androgenic and antiandrogenic activity in castrate-immature male rats. Vt: *Current Protocols in Toxicology* 16.9.1–16.9.15. J Wiley and Sons Inc.
- 4) OECD (2006). Final OECD report of the initial work towards the validation of the rat Hershberger assay. Phase 1. Androgenic response to testosterone propionate and anti-androgenic effects of flutamide. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 62. ENV/JM/MONO(2006)30.
- 5) OECD (2008). Report of the OECD Validation of the Rat Hershberger Bioassay: Phase 2: Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and a 5 α -Reductase Inhibitor in Dose Response Studies by Multiple Laboratories. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 86. ENV/JM/MONO(2008)3.
- 6) OECD (2007). Report of the Validation of the Rat Hershberger Assay: Phase 3: Coded Testing of Androgen Agonists, Androgen Antagonists and Negative Reference Chemicals by Multiple Laboratories. Surgical Castrate Model Protocol. Environmental Health and Safety, Monograph Series on Testing and Assessment N° 73. ENV/JM/MONO(2007)20.
- 7) Owens, W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray, Jr, LE (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269.

▼ M5

- 8) Owens W, Gray LE, Zeiger E, Walker M, Yamasaki K, Ashby J, Jacob E (2007). The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses: phase 2 dose-response studies. *Environ Health Perspect.* 115(5):671–8.
- 9) Korenchevsky V (1932). The assay of testicular hormone preparations. *Biochem J*26:413–422.
- 10) Korenchevsky V, Dennison M, Schalit R (1932). The response of castrated male rats to the injection of the testicular hormone. *Biochem J*26:1306-1314.
- 11) Eisenberg E, Gordan GS (1950). The levator ani muscle of the rat as an index of myotrophic activity of steroidal hormones. *J Pharmacol Exp Therap* 99:38–44.
- 12) Eisenberg E, Gordan GS, Elliott HW (1949). Testosterone and tissue respiration of the castrate male rat with a possible test for myotrophic activity. *Endocrinology* 45:113–119.
- 13) Hershberger L, Shipley E, Meyer R (1953). Myotrophic activity of 19-nortestosterone and other steroids determined by modified levator ani muscle method. *Proc Soc Exp Biol Med* 83:175–180.
- 14) Hilgar AG, Vollmer EP (1964). *Endocrine bioassay data: Androgenic and myogenic*. Washington DC: United States Public Health Service.
- 15) Dorfman RI (1969). *Androgens and anabolic agents*. Vt: *Methods in Hormone Research*, volume IIA. (Dorfman RI, ed.) New York:Academic Press, 151–220.
- 16) Massaro EJ (2002). *Handbook of Neurotoxicology*, volume I. New York: Humana Press, p 38.
- 17) OECD (2000). *Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation*. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 19. ENV/JM/MONO(2000)7.
- 18) OECD (1982). *Organization for Economic Co-operation and Development — Principles of Good Laboratory Practice*, ISBN 92–64-12367-9, Paris.
- 19) OECD (2008). *Acute oral toxicity — up-and-down procedure*. OECD Guideline for the testing of chemicals No 425.
- 20) OECD (2001). *Guidance document on acute oral toxicity*. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 24. ENV/JM/MONO(2001)4.
- 21) Supplemental materials for Owens et al. (2006). The OECD programme to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for in vivo androgen and antiandrogen responses. Phase 1: Use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol. *Env. Health Persp.* 114:1265-1269. See, section II, The dissection guidance provided to the laboratories: <http://www.ehponline.org/docs/2006/8751/suppl.pdf>.
- 22) Korea Food and Drug Administration. *Visual reference guide on Hershberger assay procedure, including a dissection video*. http://rndmoa.kfda.go.kr/endocrine/reference/education_fr.html.
- 23) OECD (2008). *Background Review Document on the Rodent Hershberger Bioassay*. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 90. ENV/JM/MONO(2008)17.
- 24) OECD (2008). *Draft Validation report of the Intact, Stimulated, Weanling Male Rat Version of the Hershberger Bioassay*.
- 25) OECD (2009). *Guidance Document on the Weanling Hershberger Bioassay in rats: A shortterm screening assay for (anti)androgenic properties*. Series on Testing and Assessment, Number 115.

▼ **M5**

- 26) Euroopa Parlamendi ja nõukogu direktiiv 2010/63/EL, 22. september 2010, teaduslikel eesmärkidel kasutatavate loomade kaitse kohta (ELT L 276, 20.10.2010, lk 33).
- 27) Käesoleva lisa järgmised peatükid:
 - B.1a. Äge suukaudne mürgisus — kindla annuse protseduur
 - B.1b. Äge suukaudne mürgisus — ägeda mürgisusastme meetod

▼ **M5****B.56. LAIENDATUD ÜHE PÕLVKONNA REPRODUKTIIVTOKSILISUSE UURING**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 443 (2012). See põhineb Rahvusvahelise Bioteaduste Instituudi (Life Science Institute, ILSI), Tervise- ja Keskkonnateaduste Instituudi (Health and Environmental Sciences Institute, HESI), põllumajanduskemikaalide ohutuse hindamise (Agricultural Chemical Safety Assessment, ACSA) tehnilise komitee ettepanekul võtta aluseks elujärgu F₁ laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuring, mille on avaldanud Cooper *et al.*, 2006 (1). Uuringu eeskirja on täiustatud ja selgitatud, et tagada paindlikkust ja rõhutada, et oluline on alustada olemasolevatest teadmistest ja kasutada uuringu suunamiseks ja kohandamiseks elusloomadega tehtud tähelepanekuid. Käesolevas katsemeetodis on üksikasjalikult kirjeldatud laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu läbiviimist. Katsemeetodis kirjeldatakse kolme F₁-loomade kohorti:

kohort 1: hinnatakse paljunemist ja arengut iseloomustavaid näitajaid; seda kohorti võib laiendada, et hõlmata F₂-põlvkond;

kohort 2: hinnatakse kemikaaliga kokkupuute võimalikku mõju arenevale närvisüsteemile;

kohort 3: hinnatakse kemikaaliga kokkupuute võimalikku mõju arenevale immuunsüsteemile.

2. Otsused selle kohta, kas hinnata teist põlvkonda ja jätta ära arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse kohort ja/või arenguhäireid põhjustava immuunotoksilisuse kohort, peaksid põhinema olemasolevatel teadmistel uuritava kemikaali kohta, samuti mitmesuguste reguleerivate asutuste vajadustel. Katsemeetodi eesmärk on anda üksikasjalist teavet selle kohta, kuidas uuringut võib teostada ja kuidas iga kohorti tuleks hinnata.
3. Otsustamise kord, millise sisekriteeriumi põhjal algatatakse 2. põlvkonna uuring, on kirjeldatud OECD suunisdokumendis 117 (39) reguleerivate asutuste jaoks, kes kasutavad sisekriteeriume.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

4. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu peamine eesmärk on hinnata konkreetseid eluetappe, mida ei hõlma muud tüüpi mürgisuse uuringud, ja uurida toimet, mis võib ilmned a kemikaaliga sünnieelse ja -järgse kokkupuute puhul. Paljunemise funktsiooniga seotud näitajate uurimiseks on kavandatud, et esimese etapina tuleb võimaluse korral kasutada korduvdoosi uuringutest saadud teavet (sh reproduktiivtoksilisuse söeluuringud, nagu OECD katsejuhend 422 (32)) või kiireid sisesekretsioonisüsteemi häirivate kemikaalide söelkatseid (nt uterotroofne katse, katsemeetod B.54 (36), ja Hershbergeri katse, katsemeetod B.55 (37)), et teha kindlaks mõju isas- ja emasloomade reproduktiivorganitele. See võib hõlmata spermatogeneesi (munandite histopatoloogia) isasloomadel ning innatsükleid, folliikulite loendamist või munarakkude valmimist ja munasarjade kahjustusi (histopatoloogia) emasloomadel. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuring võimaldab leida paljunemisega seotud näitajaid, mille määramiseks on vaja isasloomade suhtlemist emasloomadega, emasloomade vastastikust toimet areneva looteaga ning emasloomade suhtlemist järglaste ja F₁-põlvkonnaga kuni ajani pärast seksuaalse küpsuse saabumist (vt käesolevat katsemeetodit toetav OECD juhenddokument nr 151 (40)).

▼ M5

5. Katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata kemikaaliga sünnieelse ja -järgse kokkupuute mõju arengule, samuti selleks, et põhjalikult hinnata süsteemset toksilisust tiinete ja imetavate emasloomade, noorte ja täiskasvanud järglaste puhul. Katsega tahetakse üksikasjalikult uurida peamisi arenguga seotud näitajaid, nagu järglaste eluvõime, vastündinute tervise seisund, sünniaegsed arengunäitajad ning füüsiline ja funktsionaalne areng kuni täisikka jõudmiseni, et teha kindlaks konkreetset sihtelundid järglaste puhul. Lisaks annab uuring teavet uuritava kemikaali mõju kohta täiskasvanud isas- ja emasloomade reproduktiivsüsteemi kahjustuste ja toimimise kohta või kinnitab sellist teavet. Muu hulgas vaadeldakse järgmisi näitajaid: gonaadide toimimine, innatsükkel, spermatoosidide küpsemine munandimastest, paaritumiskäitumine, viljastumine, tiinus, poegimine ja imetamine. Lisaks võimaldab arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse ja arenguhäireid põhjustava immuun toksilisuse kohta saadav teave iseloomustada mõju nimetatud süsteemidele. Nende katsetega saadavad andmed peaksid võimaldama määrata täheldatavat kahjulikku toimet mitteavaldava doosi (NOAEL), vähima täheldatavat kahjulikku toimet avaldava doosi (LOAEL) ja/või võrdlusdoosid mitmesuguste näitajate puhul ning võimaldama selgitada varasemates korduvdoosi uuringutes täheldatud mõju või aitama kavandada edasisi uuringuid.

6. Katse-eeskirja skeem on esitatud joonisel 1. Uuritavat kemikaali manustatakse erinevates doosides pidevalt mitmele suguküpsete isas- ja emasloomade rühmale. Vanemate (P) põlvkonna katseloomadele manustatakse kemikaali teatava aja jooksul enne paaritumist (aeg valitakse uuritava kemikaali kohta teadaoleva teabe alusel, kuid vähemalt kaks nädalat) ja kahe nädalase paaritumisperioodi ajal. P isasloomadele manustatakse kemikaali vähemalt kuni F₁-järglaste võõrutamiseni. Kemikaali tuleks neile manustada vähemalt 10 nädala jooksul. Kemikaali võib manustada ka kauem, kui on vaja selgitada mõju paljunemisele. P-põlvkonna emasloomadele jätkatakse kemikaali manustamist tiinuse ja imetamise ajal kuni katse lõpetamiseni pärast järglaste võõrutamist (st 8–10 nädalat). F₁-järglastele manustatakse uuritavat kemikaali edasi võõrutusperioodist kuni täiskasvanuks saamiseni. Kui hinnatakse teist põlvkonda (vt OECD juhenddokument nr 117 (39)), jätkatakse F₁-järglastele kemikaali manustamist kuni F₂-põlvkonna võõrutamiseni või uuringu lõpetamiseni.

7. Kõikidel loomadel tehakse kliinilisi vaatlusi ja patoloogilisi uuringuid mürgistuse sümptomite tuvastamiseks; erilist tähelepanu pööratakse isas- ja emasloomade reproduktiivsüsteemi rikkumataolekule ja selle toimimisele, samuti järglaste tervisele, kasvule, arengule ja toimimisele. Võõrutamise ajal määratakse valitud järglased allrühmadesse (kohordid 1–3, vt punktid 33 ja 34 ning joonis 1) edasiseks uurimiseks, mis hõlmab seksuaalse küpsemise, suguelundite struktuurikahjustuste ja toimimise, neuroloogiliste ja käitumuslike näitajate ning immuunfunktsioonide uurimist.

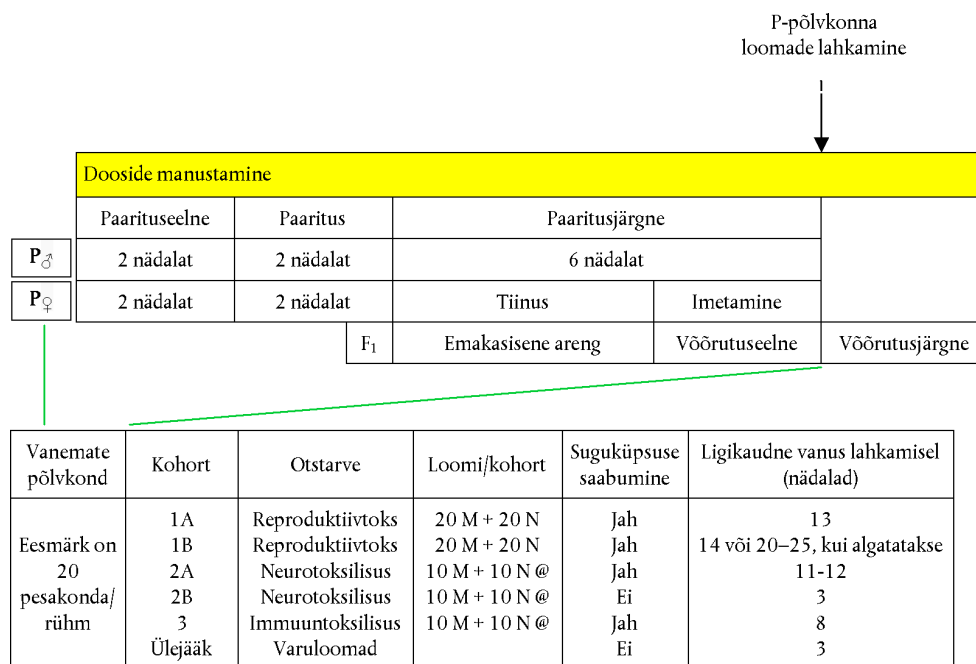
8. Uuringu tegemisel järgitakse juhtpõhimõtteid ja kaalutlusi, mis on esitatud OECD juhenddokumendis nr 19 ohutuse hindamisel kasutatavatel katseloomadel avalduvate kliiniliste tunnuste kui humaansete näitajate kindlakstelemise, hindamise ja kasutamise kohta (34).

▼ M5

9. Kui on olemas piisav arv uuringuid, et teha kindlaks uue uurimismeetodi mõju, vaadatakse katsemeetod läbi ja vajaduse korral muudetakse, et võtta arvesse saadud kogemused.

Joonis 1

Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu skeem



@ üks pesakonna kohta ja esindab võimaluse korral kokku 20 pesakonda

MEETODI KIRJELDUS JA KATSE ETTEVALMISTAMINE

Loomad*Loomaliigi ja -liini valimine*

10. Reproduktiivtoksilisuse katses kasutatava loomaliigi valimist tuleks hoolikalt kaaluda ja võtta arvesse kogu kättesaadav teave. Kuna rotiga on olemas väga palju taustaandmeid ja on võimalikud võrdlused üldise mürgisuse katsetega, on eelistatud liigiks tavaliselt rott ning käesolevas meetodi kirjelduses esitatud kriteeriumid ja soovitusel kehtivad roti kohta. Kui kasutatakse muud liiki, tuleks seda põhjendada ja teha asjaomased muudatused katse-eeskirjas. Liine, kellel on madal sigivus või kellel teatakse olevat iseeneslikke arenguhäireid, ei tohiks kasutada.

Vanus, kehamass ja katses kasutamise kriteeriumid

11. Vanematena (*parent*, P) tuleks kasutada terveid loomi, keda ei ole varem katsetes kasutatud. Tuleks uurida nii isas- kui ka emasloomi ja emasloomad peaksid olema poegimata ja mitte tiined. P-loomad peaksid olema saavutanud suguküpsuse, olema dooside manustamise alguses sarnase kehamassiga (samast soost loomade hulgas), olema paaritamise ajal sarnases vanuses (ligikaudu 90 päeva) ning olema tüüpilised uuringus kasutatava loomaliigi ja -liini jaoks. Loomadel tuleks pärast saabumist lasta vähemalt 5 päeva aklimatiseeruda. Loomad määratakse juhuvaliku alusel kontroll- ja doosirühmadesse niimoodi, et rühmades olevate loomade kehamassi keskväärtused oleksid võrreldavad (st ± 20 % keskväärtusest).

▼ M5

Pidamis- ja söötistingimused

12. Loomade katseruumi temperatuur peaks olema 22 °C (± 3 °C). Suhteline õhuniiskus peaks olema 30–70 %, ideaaljuhul 50–60 %. Kunstlik valgustus peaks olema järgmine: 12 tundi valgust, 12 tundi pimedust. Kasutada võib tavapäraselt katseloomadele ettenähtud sööta ning joogivee hulk peab olema piiramatult. Erilist tähelepanu tuleks pöörata sööda fütoöstrogeenisaldusele, kuna fütoöstrogeenide suur sisaldus söödas võib mõjutada reproduktiiv-funktsiooni määratavaid näitajaid. Soovitatakse kasutada standarditud, teadaoleva koostisega sööta, milles östrogeensete kemikaalide sisaldus on vähendatud (2, 30). Söödavalikut võib mõjutada vajadus kindlustada sobiva lisasegu lisamine, kui uuritavat kemikaali manustatakse sellisel viisil. Tuleks määrata uuritava kemikaali sisaldus, homogeensus ja stabiilsus kandaines. Söödas ja joogivees tuleks korrapäraselt määrata saasteainete sisaldus. Uuringu ajal kasutatud iga söödapartii proovid tuleks säilitada sobivates tingimustes (nt külmutatult -20 °C juures) kuni uuringu lõpuni juhiks, kui tulemustest selgub, et sööda komponente oleks vaja täiendavalt uurida.
13. Loomad peavad olema puurides väikeste rühmadena, igas puuris on samast soost ja sama doosirühma loomad. Loomi võib hoida ka üksikult, et vältida võimalikke vigastusi (nt isasloomad pärast paaritumisperioodi). Paaritumine peab toimuma selleks ettenähtud sobivates puurides. Kui on saadud tõendid kopulatsiooni kohta, paigutatakse tiineks peetavad emasloomad eraldi poegimis- või pesakonnapuuridesse ja varustatakse nad ettenähtud sobiva ja kindlaksmääratud pesamaterjaliga. Pesakondi peetakse koos emaga kuni võõrutamiseni. F₁-loomi tuleb pidada väikeste rühmadena, igas puuris on samast soost ja sama doosirühma loomad võõrutusperioodist kuni uuringu lõpetamiseni. Kui see on teaduslikult põhjendatud, võib loomi pidada üksikult. Fütoöstrogeenide sisaldus valitud allapanumaterjalis peaks olema minimaalne.

Loomade arv ja märgistamine

14. Tavaliselt peaks igas doosi- ja kontrollrühmas olema piisav arv paarituvaid loomi, nii et igas doosirühmas oleks vähemalt 20 tiinet emaslooma. Eesmärk on saada piisavalt tiinusjuhtumeid, et oleks võimalik mõistlikult hinnata kemikaali võimet mõjutada P-põlvkonna viljakust, tiinust ja vane-makäitumist ning F₁-põlvkonna järglaste kasvu ja arengut viljastumisest kuni suguküpsuseni. Kui vajalikku arvu tiineid loomi ei saada, ei tähenda see veel tingimata katse kehtetuks tunnistamist; iga üksiku juhtu tuleb eraldi hinnata ja kaaluda, kuivõrd see võib mõjutada uuritava kemikaali hindamist.
15. Igale P-loomale omistatakse kordumatu tunnusnumber enne dooside manustamise algust. Kui varasemad laboriandmed näitavad, et olulisel osal emasloomadest ei tarvitse esineda korrapäraseid innatsükleid (4 või 5 päeva), soovitatakse enne dooside manustamise algust hinnata innatsükleid. Alternatiivina võib rühmasid suurendada, et vähemalt 20 emasloomal igas rühmas oleksid tagatud korrapäraseid innatsükleid (4 või 5 päeva) dooside manustamise alguses. Vastsündinute esmakordsel vaatlusel sündimispäeval või sündimisele järgneval päeval (*postnatal day*, PND) 0 või 1 märgistatakse kõik F₁-järglased kordumatu märgisega. Andmeid F₁-järglaste ja, vajaduse korral, F₂-järglaste päritolupesakonna kohta tuleb säilitada kogu uuringu jooksul.

▼ **M5****Uuritav kemikaal**

Olemasolev teave uuritava kemikaali kohta

16. Oluline on läbi vaadata olemasolev teave, et teha otsused manustamisviisi, kandeaine, loomaliigi, dooside valiku kohta, samuti otsused dooside manustamise ajakava võimaliku muutmise kohta. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu kavandamisel tuleks seepärast võtta arvesse kogu asjakohane olemasolev teave: uuritava kemikaali füüsikalises-keemilises ja toksiko-kineetilises omadused (sealhulgas liigispetsiifiline metabolism), toksikodünaamilised omadused, struktuuri-aktiivsuse sõltuvused (SAR), *in vitro* kindlaks tehtud metaboolsed protsessid, mürgisuse uuringute tulemused ja asjakohane teave struktuurianaloogide kohta. Esialgset teavet imendumise, jaotumise, metabolismi ja väljutamise (ADME) ning bioakumulatsiooni kohta võib tuletada keemilisest struktuurist, füüsikalises-keemilistest andmetest, plasmavalkude sidumise ulatusest või toksiko-kineetilistest (TK) uuringutest, samal ajal kui mürgisusuuringute tulemused annavad lisa-teavet, nt NOAELi, metabolismi või selle indutseerimise kohta.

Toksiko-kineetiliste andmete kaalumise

17. Kuigi TK andmeid ei nõuta, võivad varasemad TK andmed doosivahemiku määramise või muudest katsetest olla uuringu kavandamisel, dooside valimisel ja tulemuste tõlgendamisel olla väga kasulikud. Eriti kasulikud on andmed, mis: 1) lubavad kontrollida areneva loote ja poegade kokkupuudet uuritava kemikaaliga (või asjakohaste metaboliitidega), 2) võimaldavad saada sisemise dosimeetria hinnangu ja 3) võimaldavad hinnata võimalikke doosist sõltuvaid küllastunud kineetilisi protsesse. Täiendavaid TK andmeid, näiteks metaboliidiprofiile, kontsentratsiooni-aja kõveraid jne, tuleks samuti arvesse võtta, kui need on kättesaadavad. Täiendavaid TK andmeid võib koguda ka põhikatte ajal tingimusel, et see ei takista põhiuuringu näitajate kogumist ja tõlgendamist.

Üldjuhul on laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu kavandamisel kasulikud järgmised TK andmed:

- hiline tiinus (nt 20. päev pärast tiinestumispäeva) — emalooma veri ja loote veri;
- keskmine imetamisperiood (PND 10) — ema veri, järglaste veri ja/või piim;
- varajane võõrutusjärgne periood (nt PND 28) — võõrutatud poegade vereproovid.

Konkreetsete analüüsitava aine (nt lähtekemikaal ja/või metaboliidid) ja proovivõtmise kava kindlaksmääramisel tuleks olla paindlik. Näiteks sõltub teataval proovivõtupäeval võetavate proovide arv ja võtmise aeg kokkupuutumistest ja eelteadmistest TK omaduste kohta mittetiine looma puhul. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, on piisav, kui proove võetakse kõikidel päevadel ühel sobival ajal; dooside manustamisel sondi kaudu võib vaja olla täiendavaid proovivõtuaegu, et saaks paremini hinnata sisemiste dooside vahemikku. Siiski ei ole vaja ühelgi proovide võtmise päeval saada kontsentratsiooni ajast sõltuvuse täielikku kõverat. Vajaduse korral võib ühes pesakonnas kummastki soost loodete ja vastsündinute vereproovid koondada.

▼ **M5***Manustamistee*

18. Manustamistee valimisel tuleks arvestada kokkupuuteviise, mis on inimese kokkupuute puhul kõige asjakohasemad. Kuigi katse-eeskiri on koostatud nii, et uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib seda muuta, et manustada kemikaali muul viisil (joogivee, sondi kaudu, sissehingamise teel, naha kaudu), olenevalt kemikaali omadustest ja teabest, mida tahetakse saada.

Kandeaine valimine

19. Vajaduse korral lahustatakse või suspendeeritakse uuritav kemikaal sobivas kandeaines. Soovitatakse võimaluse korral kaaluda kõigepealt vesilahuse/-suspensiooni kasutamist, seejärel õlilahuse/õlispensiooni (nt maisiõli) kasutamist. Muu kandeaine kui vee puhul tuleks teada kandeaine mürgiseid omadusi. Tuleks vältida selliste kandeainete kasutamist, mis võivad ise olla mürgised (nt atsetoon, dimetüülsulfoksiid). Tuleks määrata uuritava kemikaali stabiilsus kandeaines. Kandeaine või muu lisaaine kasutamisel tuleks kaaluda järgmist: nende mõju uuritava kemikaali imendumisele, jaotumisele, metabolismile või peetumisele organismis; mõju uuritava kemikaali keemilistele omadustele, mis võib muuta selle toksilisi omadusi, ning mõju loomade sööda- või veetarbimisele või toitumisele.

Doosi valimine

20. Tavaliselt peaks uuring hõlmama vähemalt kolme doosimäära ja samaaegset kontrolli. Sobiva doositaseme valimisel peab uurija arvestama kogu kättesaadavat teavet, sealhulgas varasemate uuringutega dooside kohta saadud teavet, tiinete ja mittetiinete loomadega saadud toksiko-kineetilisi andmeid, imetamisel piimaga edasikandumise ulatust ja inimeste kemikaaliga kokkupuute hinnanguid. Kui on olemas TK andmed, mis näitavad TK-protsesside küllastumist dooside suurendamise korral, tuleks vältida suurte dooside kasutamist, mille juures selgelt esineb küllastumine, loomulikult tingimusel, et inimeste kokkupuude on eeldatavasti tunduvalt allpool küllastumispunkti jõudmist. Sellistel juhtudel peaks suurim doos olema murdepunkti kohal või veidi üle selle punkti, kus algab mittelineaarne toksiko-kineetika.
21. Kui asjakohased TK andmed puuduvad, peaksid doositasemed põhinema mürgisusel, kui neid ei piira uuritava kemikaali füüsikalise-keemilised omadused. Kui doositasemed põhinevad mürgisusel, valitakse kõrgeim doos nii, et see põhjustaks teatavat süsteemset toksilisust, kuid mitte loomade surma ega tõsiseid kannatusi.
22. Doosimäärade alanev järjestus tuleks valida nii, et näidata doosiga seotud mõju ja teha kindlaks täheldatavat kahjulikku toimet mitteamaldav doos või mõju avastamise piiri lähedane doos, mis võimaldaks leida võrdlusdoosi kõige tundlikuma(te) näitaja(te) jaoks. Sageli on optimaalsed kahe- või neljakordsed dooside vahemikud, et dooside vahemik NOAELi ja LOAELi vahel ei oleks liiga suur. Väga suure doosivahemiku (nt üle 10 korra) kasutamisele on sageli eelistatav neljanda doosirühma lisamine.
23. Kontrollrühma loomi koheldakse samamoodi kui doosirühma loomi, välja arvatud uuritava kemikaali manustamine. Kontrollrühm on rühm, kellele doose ei manustata või manustatakse kahjutut ainet või kandeainet, kui uuritava kemikaali manustamisel kasutatakse kandeainet. Kui kasutatakse kandeainet, saab kontrollrühm kandeainet suurimas kasutatud mahus.

▼ **M5***Piirsalduskatse*

24. Kui korduvdoosi uuringutes ei ole leitud tõendeid mürgisuse kohta doosis vähemalt 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas või kui andmete põhjal, mis on saadud struktuuri või metabolismi poolest sarnaste kemikaalidega (metabolism on *in vivo* või *in vitro* andmete järgi sarnane), ei pruugi mitme doositasemega uuring olla vajalik. Sellisel juhul võiks laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu teha kontrollrühma ja ainult ühe doosirühmaga, milles doos on 1 000 mg kehamassi kg kohta päevas. Kui aga sellise piirsalduskatsega leitakse tõendeid reproduktiivtoksilisuse või arenguhäireid põhjustava toksilisuse kohta, tuleb teha uuring madalamate doositasemetega, et leida NOAEL. Sellised kaalutlused piirsalduskatse kohta kehtivad ainult juhul, kui inimese kokkupuude ei viita sellele, et on vaja uurida kõrgemat doositaset.

EESKIRJAD

Järglaste kokkupuude

25. Kemikaali manustamine sööda kaudu on eelistatud meetod. Sondiuuringute tegemise kohta tuleks märkida, et imetatavad pojad saavad uuritavat kemikaali tavaliselt üksnes kaudselt, piimaga; otsene dooside manustamine algab nende jaoks võõrutamise ajal. Sööda või joogiveega manustamise uuringutes hakkavad pojad uuritavat kemikaali otse saama siis, kui nad imetamisperioodi viimasel nädalal hakkavad ise sööma. Kui uuritavat kemikaali eritub piima sisse vähe ja kui ei saa tõendada järglaste pidevat kokkupuudet kemikaaliga, tuleks kaaluda uuringu korralduse muutmist. Sellistel juhtudel tuleks kaaluda vahetut manustamist poegadele imetamise ajal, võttes arvesse TK kohta olemas olevat teavet, toksilisust järglastele või muutusi biomarkerites (3, 4). Enne imetatavatele poegadele dooside otsese manustamise uuringu tegemist tuleks hoolikalt kaaluda eeliseid ja puudusi (5).

Doseerimise ajakava ja doseerimine

26. Teave innatsükli, isas- ja emassuguelundite histopatoloogia ja munandi-/munandimanuse spermaanaluüsi kohta võib olla juba varem saadud piisavalt pikkade korduvdoosiuuringutega. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringus valitakse paarituseelse dooside manustamise kestus nii, et näha mõju funktsionaalsetele muutustele, mis võivad segada paaritumiskäitumist ja viljastamist. Paarituseelne dooside manustamine peab olema piisavalt pikk, et saavutada füsioleku kokkupuutetingimused P põlvkonna emas- ja isasloomade puhul. Enamikul juhtudel peetakse mõlema soo puhul piisavaks kahe nädalast dooside manustamist enne paaritumist. Emasloomade puhul hõlmab see 3–4 täielikku innatsüklit ja see peaks olema piisav, et avastada kõik kahjulikud mõjud innatsüklile. Isasloomade puhul vastab see ajale, mis kulub küpseva spermatoosoidi liikumiseks läbi munandimanuse, ja see peaks lubama avastada paaritamisel munandijärgse mõju spermale (spermatogeneesi lõppstaadiumides ja munandimanuses küpsemise ajal). Uuringu lõpetamise ajaks, kui uuritakse munandi ja munandimanuse histopatoloogiat ja tehakse sperma näitajate analüüs, on P- ja F₁-põlvkonna isasloomad uuritava kemikaaliga kokku puutunud vähemalt ühe täieliku spermatogeneesi protsessi jooksul (6, 7, 8, 9) ja OECD juhenddokument nr 151 (40)).

▼ M5

27. Paaritumiseelse kokkupuute stsenaariume isasloomade puhul võiks kohandada, kui varasemate uuringutega on selgelt kindlaks tehtud mürgisus munandite jaoks (spermatogeneesi häired) või mõjud seemnerakkude struktuurile ja funktsioonile. Samamoodi võib emasloomade puhul olla põhjendatud kokkupuutesenaariumi muutmine, kui on teada, et uuritav kemikaal mõjutab innatsükli ja seega tiinestumisvõimet. Erijuhtudel võib olla lubatav, et P-põlvkonna emasloomadele hakatakse uuritavat kemikaali manustama alles pärast seda, kui on saadud sperma suhtes positiivne tupeäie (vt OECD juhenddokument nr 151 (40)).
28. Kui paaritumiseelne kemikaali manustamise periood on kindlaks määratud, tuleks uuritavat kemikaali loomadele pidevalt manustada 7 päeval nädalas kui lahkamiseni. Kõigile loomadele tuleks uuritavat kemikaali manustada sama meetodiga. Dooside manustamist tuleks jätkata 2-nädalase paaritumisperioodi jooksul ja P-põlvkonna emasloomadele kogu tiinuse ja imetamise vältel kuni uuringu lõpetamiseni pärast võõrutamist. Isasloomadele tuleb doose manustada samal viisil kuni katse lõpetamiseni, kui F₁-põlvkonna loomad võõrutatakse. Lahkamise juures tuleks eelkõige pidada kinni emaste lahkamise ajakavast, kuna emasloomad tuleks lahata ühel ja samal või lähedasel imetamispäeval. Isasloomade lahkamine võib jaotuda suuremale arvule päevadele, olenevalt labori võimalustest. Kui otsest dooside manustamist ei ole alustatud juba imetamise ajal, alustatakse valitud F₁-põlvkonna isas- ja emasloomadele kemikaali otsest manustamist võõrutamise ajal ja seda tuleks jätkata kuni kavandatud lahkamiseni, sõltuvalt kohorti määramisest.
29. Kemikaalide puhul, mida manustatakse sööda või joogiveega, on oluline tagada, et sisseantavad uuritava kemikaali kogused ei muudaks tavalist toitumise või joogivee tarbimise tasakaalu. Kui uuritavat kemikaali manustatakse söödaga, võib kasutada kas püsivat kontsentratsiooni söödas (ppm) või püsiva suurusega doosi vastavalt looma kehamassile; valitud võimalus tuleks selgelt määratleda.
30. Kui uuritavat kemikaali manustatakse sondiga, ei tohiks ühe korraga manustatav vedelikukogus ületada tavaliselt 1 ml 100 g kehamassi kohta (õli, näiteks maisiõli puhul on maksimumkogus 0,4 ml 100 g kehamassi kohta). Välja arvatud ärritavad või söövitavad kemikaalid, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katses kasutatavate mahtude varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide dooside korral jääks samaks. Doos tuleks manustada iga päev samal kellaajal. Iga looma doos peab tavaliselt põhinema kõige viimaselkehamassi määramisel ja seda kohandatakse vähemalt kord nädalas täiskasvanud isas- ja täiskasvanud viljastamata emaslooma puhul ning iga kahe päeva järel tiine emaslooma ja F₁-põlvkonna loomadel, kui kemikaali manustatakse enne võõrutamist ja 2 nädala jooksul pärast võõrutamist. Kui TK andmed viitavad uuritava kemikaali vähesele ülekandele läbi platsenta, tuleb tiinuse viimasel nädalal võib-olla kohandada sondiga manustatavat doosi, et vältida tiinele emasloomale liiga mürgise doosi manustamist. Emasloomale ei tohiks poegimise päeval kemikaali manustada sondiga või muul viisil, mille juures emasloom tuleb kätte võtta; kemikaali manustamata jätmine sel päeval on parem kui poegimisprotsessi häirimine.

▼ **M5****Paaritumine**

31. Iga P-põlvkonna emane tuleks panna ühte puuri ühe juhuslikult valitud mitte suguluses oleva isasloomaga, kes kuulub samasse doosirühma (paaritamine 1: 1), kuni täheldatakse kopulatsiooni tõendeid või on möödunud 2 nädalat. Kui isasloomi ei ole piisavalt, kuna isasloomi on näiteks surnud enne paaritumist, võib panna juba pairitunud (1: 1) isaslooma kokku teise emasloomaga, nii et kõik emasloomad saavad pairitatud. Tiinuse 0-päevaks peetakse päeva, mil leitakse tõendeid paaritumise kohta (leitakse vaginaalkork või spermat). Loomad tuleks teineteisest võimalikult kiiresti eraldada pärast tõendite saamist kopulatsiooni toimumise kohta. Kui paaritumine ei ole kahe nädala pärast toimunud, tuleks loomad eraldada, andmata neile täiendavat võimalust paaritumiseks. Pairitunud paarid tuleks andmetes selgesti ära näidata.

Pesakonna suurus

32. Neljandal poegimisjärgsel päeval võib iga pesakonna suurust korrigeerida, eemaldades juhuvalikuga liigsed pojad nii, et tulemuseks oleks võimalikult täpselt viis emast ja viis isast pesakonna kohta. Poegade selektiivne kõrvaldamine, näiteks kehamassi põhjal, ei ole sobiv. Kui emaste või isaste poegade arv ei võimalda koostada pesakonda viiest kummaski soost pojast, on sobiv ka osaline korrigeerimine (nt kuus isast ja neli emast).

Poegade valimine võõrutusjärgsete uuringute jaoks (vt joonis 1)

33. Võõrutamisel (umbes päeval PND 21) valitakse kõigist kättesaadavatest pesakondadest pojad edasiseks uurimiseks, kuni 20 poega igasse doosirühma ja kontrollrühma, ning peetakse neid kuni suguküpsuse saabumiseni (kui katseid ei ole vaja teha varem). Pojad valitakse juhuvaliku alusel, kuid välja jäetakse ilmselt kängujäänud pojad (loomad, kelle kehamass erineb keskmisest sama pesakonna järglase kaalust rohkem kui kahe standardhälbe võrra), kuna selliseid poegi ei saa pidada katserühma suhtes esindavaks.

Päeval PND 21 määratakse välja valitud F₁-põlvkonna pojad juhuvaliku alusel ühte loomade kolmest kohordist:

kohort 1 (1A ja 1B) = reproduktiivtoksilisuse/arenguhäireid põhjustava toksilisuse katse;

kohort 2 (2A ja 2 B) = arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse katse;

kohort 3 = arenguhäireid põhjustava immuuntoksilisuse katse.

Kohort 1A: üks isas- ja üks emasloom/pesakond/rühm (20/sugu/rühm): eelistatud valik reproduktiivsüsteemi ja üldise mürgisuse esmaseks hindamiseks.

Kohort 1B: üks isas- ja üks emasloom/pesakond/rühm (20/sugu/rühm): eelistatud valik paljunemisfunktsiooni hindamiseks pairituvaltel F₁-loomadel, kui seda hinnatakse (vt OECD juhenddokument nr 117 (39), ja täiendavate histopatoloogiaandmete saamiseks, kui kahtlustatakse reproduktiivsüsteemi või sisesekreetsiooni kahjustavat mürgisust või kui kohordi 1A tulemused ei ole ühesed.

Kohort 2A: kokku 20 poega rühma kohta (10 isast ja 10 emast rühma kohta; üks isasloom ja üks emasloom pesakonna kohta), mis eraldatakse käitumishäirete neuroloogia uurimiseks. millele järgneb täiskasvanute neurohistopatoloogiline hindamine.

Kohort 2B: kokku 20 poega rühma kohta (10 isast ja 10 emast rühma kohta; üks isas- ja üks emasloom pesakonna kohta), mis määratakse neurohistopatoloogiauuringuks võõrutamise ajal (PND 21 või PND 22). Kui loomi ei ole piisavalt, tuleb loomad esmalt määrata kohorti 2A.

▼ **M5**

Kohort 3: kokku 20 poega rühma kohta (10 isast ja 10 emast rühma kohta; üks poeg igast pesakonnast kui võimalik). Vaja võib minna täiendavaid poegi kontrollrühmast, et nad toimiksid positiivse kontrolli loomadena T-rakkudest sõltuva antikehareaktsiooni katses (*T-cell dependant antibody response assay*, TDAR) päeval PND 56 ± 3.

34. Kui pesakonnas ei ole piisavalt poegi kõigi kohortide komplekteerimiseks, on eelistatav kohort 1, kuna seda saab laiendada F₂-põlvkonna saamiseks. Konkreetse küsimuse lahendamiseks võib igasse kohorti määrata täiendavaid poegi, näiteks kui kemikaalil kahtlustatakse neuro-, immuun- või reproduktiivtoksilisust. Selliseid poegi võib kasutada uuringuteks eri ajahetkedel või täiendavate näitajate määramiseks. Pojad, keda kohortidesse ei määrata, kasutatakse kliinilise biokeemia analüüsiks (punkt 55) ja üldiseks lahkamiseks (punkt 68).

P-loomade teine paaritamine

35. Teist paaritamist P-loomade puhul tavaliselt ei soovitata, kuna sellega kaotatakse olulist teavet pesastumiskohtade arvu kohta (ja sellega pesastumisjärgselt ja sünni läheduses hukkunud loodete arvu kohta, mis võib näidata aine võimalikku teratogeensust) esimese pesakonna puhul. Kui on vaja kontrollida või selgitada kemikaali mõju kemikaaliga kokkupuutunud emasloomadele, siis on parem laiendada uuringut ja lisada F₁-põlvkonna paaritamine. Siiski on P-põlvkonna isasloomade teine paaritamine töötlemata emasloomadega alati üks võimalus, millega saab selgitada vastuolulisi tulemusi või täiendavalt iseloomustada mõju viljakusele, mida täheldati esimesel paaritumisel.

ELUPUHUSED VAATLUSED**Kliinilised vaatlused**

36. P-põlvkonna ja valitud F₁-põlvkonna loomade üldine kliiniline vaatlus tehakse kord päevas. Kemikaali sondi kaudu manustamise korral tuleks kliinilised vaatlused teha enne ja pärast manustamist (et näha võimalikke toksilisuse märke, mis on seotud maksimaalse kontsentratsiooniga vereseerumis). Asjakohased käitumise muutused, raske või pikaleveniva poegimise märgid ja kõik mürgistuse tunnused tuleks registreerida. Kaks korda päevas, nädalavahetusel kord päevas tuleks kontrollida kõiki loomi raske mürgistuse, haigestumise või surma tuvastamiseks.
37. Lisaks uuritakse iga nädal üksikasjalikumalt kõiki P- ja F₁-põlvkonna loomi (pärast võõrutamist) ja kõige parem oleks seda teha looma kaalumise ajal, et vähendada kättevõtmisega seotud stressi. Vaatlused tuleks teha hoolikalt ja kõik leiud registreerida, kasutades katselaboris määratud punktisüsteeme. Tuleks püüda tagada, et katsetingimuste varieeruvus oleks minimaalne. Üles tuleks märkida vähemalt järgmised märgid: muutused nahal, karvastikus, silmades, limaskestadel, eritiste ja väljaheidete esinemine ning autonoomsed muutused (nt pisaravool, turris karv, pupillide suurus, muutunud hingamine). Samuti tuleks üles märkida muutused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad kättevõtmisele reageerivad, samuti kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid (nt üleäärane karvastiku hooldus, ringiratast keerlemine) või kummaline käitumine (nt enese vigastamine, tagurpidi kõndimine).

▼ **M5****Kehamass ja sööda/vee tarbimine**

38. P-põlvkonna loomad kaalutakse dooside manustamise esimesel päeval ja seejärel vähemalt kord nädalas. Lisaks kaalutakse P-põlvkonna emasloomi imetamise ajal samadel päevadel, kui kaalutakse nende pesakonna poegi (vt punkt 44). Kõik F₁-põlvkonna loomad kaalutakse individuaalselt võõrutamisel (PND 21) ja seejärel vähemalt kord nädalas. Kehamass registreeritakse ka päeval, kui loomal algab puberteet (eesnaha täielik eraldumine või tupe avanemine). Kõik loomad kaalutakse surmamisel.
39. Uuringu ajal registreeritakse sööda ja vee tarbimine (kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega) vähemalt kord nädalas samal päeval looma kehmassi registreerimisega (välja arvatud kooselu ajal). Iga puuri F₁-põlvkonna loomade söödatarbimine registreeritakse iga nädal, alates teatavasse kohorti valimisest.

Innatsükliid

40. Eelteave innatsükli muutuste kohta uuritava kemikaali toimel võib olla saadud juba varasemate korduvdoosi mürgisuse uuringutega ja seda võib kasutada konkreetse uuritava kemikaaliga tehtava laiendatud ühe-põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuringu eeskirja koostamisel. Tavaliselt alustatakse innatsükli hindamist (vaginaaltsütoloogia abil) dooside manustamise alguses ja jätkatakse kuni paaritumise kinnituse saamiseni või kahe nädalase paaritumisaja lõpuni. Kui emasloomi on enne dooside manustamist kontrollitud tavalise innatsükli seisukohast, siis on kasulik jätkata tupenõre äiete tegemist pärast dooside manustamise algust, kuid kui dooside manustamise alguses tekib kahtlus, et esineb mittespetsiifilist mõju (näiteks sööda tarbimise ilmne vähenemine kohe alguses), võib lasta loomadel dooside manustamisega kohaneda enne kahe nädalast tupenõre äiete tegemise perioodi, millele järgneb paaritamine. Kui emasloomale kemikaali manustamist niimoodi pikendatakse (st neljanädalane dooside manustamine enne paaritumist), tuleks kaaluda nooremate loomade ostmist ja pikendada isasloomadele dooside manustamist enne paaritumist. Tupe-/emakakaelarakkude võtmisel tuleks olla ettevaatlik, et vältida limaskestast kahjustamist ja seejärel pseudotiinuse teket (10, 11).
41. Tupenõre äieid tuleks uurida iga päev kõikide kohorti 1A kuuluvate F₁-põlvkonna emasloomade puhul pärast seda, kui tupp on avanenud, kuni leitakse esimene sarvestunud rakke sisaldav äie, et teha kindlaks ajavahemik nende kahe sündmuse vahel. Kõigi kohorti 1A kuuluvate F₁-põlvkonna emasloomade innatsükleid tuleks jälgida kahe nädala jooksul, alates umbes päevast PND 75. Lisaks sellele, kui F₁-põlvkonna paaritumine peaks olema vajalik, jälgitakse kohordi 1B tupe tsütoloogiat alates loomade paaridesse paigutamisest kuni kopulatsiooni tõendite saamiseni.

Paaritumine ja tiinus

42. Lisaks tavapärastele näitajatele (nt kehamass, sööda tarbimine, kliinilised tähelepanekud, sealhulgas surma ja haigestumuse kontroll) registreeritakse paaridesse paigutamise, eostamise ja poegimise kuupäev ning arvutatakse ühtimiseelne ajavahemik (paaridesse paigutamisest kuni eostamiseni) ja tiinusaeg (eostamisest kuni poegimiseni). P-põlvkonna emasloomi tuleks hoolikalt uurida eeldatava poegimistähtaja ümbruses, et teha kindlaks poegimishäirete tunnused. Registreerida tuleks kõik pesaehituskäitumise või pesakonna eest hoolitsemise kõrvalekalded.

▼ M5

43. Poegimispäev võetakse imetamispäevaks 0 (LD 0) emaslooma puhul ja sünnijärgseks päevaks 0 (PND 0) järglaste puhul. Teise võimalusena võivad kõik võrdlused põhineda ühtimisjärgsel ajal, et vältida segadust sünnijärgse arengu kirjeldamisel, mis on tingitud erinevast tiinusajast; siiski tuleb registreerida ka poegimisel põhinev ajakava. See on eriti oluline, kui uuritav kemikaal mõjutab tiinuse kestust.

Järglaste näitajad

44. Iga pesakonda vaadeldakse nii ruttu kui võimalik pärast poegimist (PND 0 või 1), et kindlaks määrata poegade arv ja sugu, surnult sündid, elussünnid ja kõik suuremad anomaaliad (väliselt nähtavad kõrvalekalded, sh suulaelõhe; nahaalused verevalumid; ebanormaalne naha värvus või tekstuur; nabaväädi olemasolu; piima puudumine maos; kuivanud eritiste esinemine). Lisaks peaks vastsündinute esimene kliiniline läbivaatus hõlmama kehatemperatuuri, aktiivsuseisundi ja kättevõtmisele reageerimise kvalitatiivset hindamist. Poegi, kes leitakse surnult päeval PND 0 või hiljem, tuleks uurida, et teha kindlaks võimalikud puuded ja surma põhjus. Elusad pojad loetakse kokku ja kaalutakse üksikuna päeval PND 0 või 1 ja edaspidi korrapäraselt, näiteks päevadel PND 4, 7, 14 ja 21. Kliinilisi vaatlusi tuleks loomade vanust arvestades korrata järglaste kaalumise ajal või sagedamini juhul, kui vastsündinul leiti mingeid konkreetseid puudeid. Täheledatavad tunnused võiksid muu hulgas hõlmata järgmist: välised anomaaliad, naha, karvastiku, silmade ja limaskestade muutused, eritiste ja väljaheidete esinemine ja autonoomse närvisüsteemi tegevuse muutused. Samuti tuleks üles märkida muutused kõnnakus, kehaasendis ja selles, kuidas loomad kättevõtmisele reageerivad, samuti kloonilised või toonilised liigutused, stereotüübid või kummaline käitumine.
45. Iga poja anogenitaalne vahemaa (*anogenital distance*, AGD) tuleks mõõta vähemalt üks kord ajavahemikus PND 0–4. Järglaste kehamassi andmed tuleks koguda AGD mõõtmise päeval ja AGD tuleks normeerida poja suurust arvestava näitajaga, eelistatult kuupjuurega kehamassist (12). Isastel järglastel tuleks rinnanibude ja nibuväljakese olemasolu kontrollida päeval PND 12 või 13.
46. Kõiki väljavalitud F₁-põlvkonna loomi hinnatakse iga päev sugutiluki ja eesnaha eraldumise (isasloom) või tupe avanemise (emasloom) suhtes, alustades juba enne nende seksuaalse küpsuse näitajate saavutamise eeldatavat aega, et teha kindlaks varane seksuaalne küpsemine. Registreerida tuleks kõik suguorganite kõrvalekalded, nagu püsijääv tupevahesein, kusiti alumise seina sulgumatus või peeniselõhe. F₁-põlvkonna loomade seksuaalset küpsust võrreldakse nende füüsilise arenguga, selleks määratakse vanus ja kehamass suguti ja eesnaha eraldumisel (isasloom) või tupe avanemisel (emasloom) (13).

Võimaliku arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse hindamine (kohordid 2A ja 2B)

47. Neurotoksilisuse hindamiseks kasutatakse 10 isas- ja 10 emaslooma kohordist 2A ning 10 isas- ja 10 emaslooma kohordist 2B igast doosirühmast (kumbagi kohorti lähevad 1 isas- ja 1 emasloom igast pesakonnast; iga pesakonda esindab vähemalt 1 järglane; kõik on valitud juhuvalikuga). Kohordi 2A loomadel kontrollitakse helisignaale reageerimist, tehakse funktsionaalvaatluste kompleksi katsed, kontrollitakse motoorset aktiivsust (vt punktid 48–50) ja hinnatakse neuropatoloogiat (vt punktid 74–75). Tuleks püüda tagada, et kõikide katsetingimuste varieeruvus oleks võimalikult väike ja et ei oleks süstemaatilist vigade mõne doosirühma suhtes.

▼ M5

Muutujate hulgas, mis võivad käitumist mõjutada, on helivaljuse tase (nt katkendlik müra), temperatuur, niiskus, valgustus, lõhnad, kellaeg ja keskkonnapoolsed tähelepanu häirijad. Neurotoksikoloogiliste katsete tulemuste tõlgendamisel tuleks arvesse võtta asjakohaseid varasemaid kontrollrühmaga määratud võrdlusvahemikke. Kohordi 2B loomi tuleks kasutada neuropatoloogilisteks hindamisteks päevadel PND 21 või 22 (vt punktid 74 ja 75).

48. Helisignaali katse tuleks teha päeval PND 24 (± 1 päev), kasutades kohorti 2A kuuluvaid loomi. Katse tegemise päev peaks olema kõigi doosirühmade ja kontrollrühmade suhtes tasakaalustatud. Iga katsesessioon koosneb 50 katsest. Helisignaali katse tegemisel määratakse keskmine reaktsiooni amplituud igas 10-katselises plokis (10-katselisi plokkide on 5), kusjuures katsetingimusi optimeeritakse, et saavutada sessiooni jooksul toimuv harjumine. Katse tegemise kord peab olema kooskõlas katsemeetodiga B.53 (35).
49. Sobival ajal PND 63 ja PND 75 vahel korraldatakse kõikide kohordi 2A loomadega funktsionaalvaatluste kompleksi katsed ja automatiseeritud motoorse aktiivsuse katse. Nende katsete tegemise kord peab olema kooskõlas katsemeetoditega B.43 (33) ja B.53 (35). Funktsionaalvaatluste kompleks hõlmab looma välimuse, käitumise ja funktsioonide kahjustatuse põhjalikku kirjeldamist. Seda hinnatakse vaatluste järgi algul kodupuuris, pärast üleviimist vaatlemiseks standardväljakule (avamaa), kus loom liigub vabalt, ja manipuleerimiskatsetega. Katsetamine peaks toimuma järjekorras kõige vähem interaktiivsetelt katsetelt kõige interaktiivsematele. 1. liites on esitatud mõõdetavate näitajate loetelu. Kõiki loomi peaks hoolikalt jälgima koolitatud vaatleja, kes ei ole teadlik, mida igale loomale manustatakse, kasutades standarditud korda, et vähendada vaatlejaga seotud varieerumist. Võimaluse korral on soovitatav, et sama vaatleja hindaks kõiki sama katse loomi. Kui see ei ole võimalik, tuleb tõendada, et tulemused ei sõltu vaatlejast. Käitumiskatsete kompleksi iga näitaja puhul kasutatakse selgeid hindamisskaalasid ja punktide andmise kriteeriume. Võimaluse korral tuleks välja töötada objektiivsed kvantitatiivsed vaatlemisnäitajad, mis hõlmavad subjektiivset taseme määramist. Iga looma mootorset aktiivsust katsetatakse eraldi. Vaatlussessioon peab olema piisavalt pikk, et demonstreerida kemikaaliga töötlemata kontrollrühmas sessiooni jooksul tekkivat harjumist. Mootorset aktiivsust tuleks mõõta salvestusseadmega automaatse aparraadi abil, millega saab määrata nii tegevuse hoogustumist kui ka vähenemist (nt tausttegevus, mida seadmega saab mõõta, ei tohiks olla nii vähene, et selle vähenemist ei õnnestu registreerida, ega nii hoogne, et selle edasist hoogustumist ei saa registreerida). Iga seadet tuleb kontrollida standardmeetodiga, et tagada, kuivõrd see on võimalik, eri seadmete mõõtmiste ja eri päevadel toimuvate mõõtmiste usaldusväärsus. Doosirühmade loomad jaotatakse eri seadmete vahel võimalikult tasakaalustatult. Doosirühmade katsed peavad toimuma tasakaalustatult eri aegadel, et tulemusi ei mõjutaks tegevuse ööpäevased rütmid.
50. Kui olemasolev teave viitab vajadusele teha muid funktsionaalseid katseid (nt sensoorseid, sotsiaalseid, kognitiivseid), tuleks need lisada muudele uuringus tehtavatele hindamistele nii, et muid hindamisi ei häiritaks. Kui kõnealuseid katseid tehakse samade loomadega, keda kasutatakse standardses helisignaali katsetes, funktsionaalvaatluste kompleksi katsetes ja motoorse aktiivsuse katsetes, tuleks kavandada erinevad katsed, et katsete kordumisest tulenev väärtulemuste oht viia miinimumini. Täiendavad uuringud võivad olla eriti kasulikud, kui empiirilised vaatlused, oodatav mõju või toimemehhanism viitavad mingile konkreetsele neurotoksilise mõju tüübile.

▼ M5

Arenguhäireid põhjustava immuuntoksilisuse võimalikkuse hindamine (kohort 3)

51. Päeval PND 56 (± 3 päeva) kasutatakse iga doosirühma kohordist 3 10 isas- ja 10 emasloom (1 isas- ja 1 emasloom pesakonna kohta; iga pesakonda esindab vähemalt 1 järglane; loomad on valitud juhuslikult) T-raku-sõltuvate antikehade reaktsiooni katseks, milles uuritakse primaarset IgM-antikeha reaktsiooni T-raku-sõltuvale antigeenile, nagu lamba punaverelibled (SRBC) või meriteo *Megathura crenulata* hemotsüaniin (KLH), kooskõlas praeguste immuuntoksilisuse kindlaksteegemise katse-eeskirjadega (14, 15). Reaktsiooni võib hinnata spetsiifiliste naaste moodustavate rakkude (*plaque-forming cells*, PFC) loendamisega põrnas või SRBC- või KLH-spetsiifilise IgM-antikeha sisalduse määramisega vereseerumis ELISA-analüüsiga reaktsiooni maksimumi ajal. Reaktsioon saavutab tavaliselt maksimumi neli (PFC-reaktsioon) või viis (ELISA) päeva pärast intravenooset immuniseerimist. Kui primaarset antikehareaktsiooni hinnatakse PFCde loendamise, siis lubatakse loomade alarühmi hinnata eri päevadel järgmistel tingimustel: alarühma immuniseerimine ja surmamine on ajastatud nii, et PFCd loendatakse reaktsiooni maksimumis; alarühmades on võrdsel hulgal isas- ja emasjärglasi kõikidest doosirühmadest, kaasa arvatud kontrollrühmad, ning alarühmi hinnatakse ligikaudu samas sünnijärgses vanuses. Kokkupuudet uuritava kemikaaliga jätkatakse kuni päevani enne põrnade kogumist PFC-reaktsiooni määramiseks või seerumi võtmist ELISA-analüüsi jaoks.

Võimaliku reproduktiivtoksilisuse järelhindamine (kohort 1B)

52. Kohordi 1B loomadele võib jätkata kemikaali manustamist pärast päeva PND 90 ja vajaduse korral lasta neil paarituda, et saada F₂-põlvkond. Samasse doosirühma kuuluvad isas- ja emasloomad pannakse kokku (vältides pesakonnakaaslaste kokku elama panemist) kuni kaheks nädalaks ajavahemikul PND 90–120. Katse korraldus on samasugune kui P-põlvkonna puhul. Olenevalt saadavatest tulemustest võib siiski olla piisav, kui lõpetada katse päeval PND 4 ja mitte jätkata katset kuni võõrutamiseni või kauem.

VAATLUSED KATSE LÕPETAMISEL**Kliiniline biokeemia ja hematoloogia**

53. Süsteemset mõju tuleks jälgida P-põlvkonna loomade puhul. Katse lõpetamisel võetakse paastuvereproovid iga doosirühma kümnel juhulvalikuga leitud P-põlvkonna isas- ja emasloomalt kindlaksmääratud kohast; proove säilitatakse asjakohastes tingimustes ning tehakse osaline või täielik hematoloogiline analüüs, kliinilis-biokeemiline analüüs, määratakse T4 ja TSH sisaldus või tehakse muud analüüsid, olenevalt uuritava kemikaali teadaolevast mõjuspektrist (vt OECD juhenddokument nr 151 (40)). Tuleks määrata järgmised hematoloogilised näitajad: hematokrit, hemoglobiini kontsentratsioon, erütrotsüütide arv, leukotsüütide üld- ja suhtarv, vereliistakute arv ning hüübimisaeg ja -võime. Vereplasmast või -seerumist tuleks määrata: glükoos, üldkolesterool, karbamiid, kreatiniin, üldvalk, albumiin ja vähemalt kaks hepatotsellulaarset mõju peegeldavat ensüümi (nt alaniinaminotransferaas, aspartaataminotransferaas, leelisene fosfataas, γ -glutamüül-transpeptidaas ja sorbitooldehüdrogenaas). Täiendavate ensüümide ja sapihapete mõõtmine võib teatavatel asjaoludel anda kasulikku teavet. Lisaks võib võtta kõikide loomade vere ja säilitada hilisemaks analüüsiks, et aidata selgitada ebaselget mõju või saada laborisiseid kokkupuudet käsitlevaid

▼ **M5**

andmeid. Kui P-loomade teist paaritumist ei ole kavandatud, võetakse vereproovid vahetult enne ettenähtud surmamist või selle osana. Kui loomad jäetakse alles, kogutakse vereproovid paar päeva enne seda, kui loomad teist korda paaritatakse. Välja arvatud juhul, kui korduvdoosiuuringute andmed osutavad, et uuritav kemikaal ei mõjuta kõnealust näitajat, tuleks enne katse lõpetamist teha uriinianalüüs ja hinnata järgmised näitajad: uriini välimus, maht, osmolaalsus või erikaal, pH, valgusisaldus, glükoosisisaldus, vere ja vererakkude sisaldus, surnud rakud. Uriini võib koguda ka uuritava kemikaali ja/või metaboliitide eritumise jälgimiseks.

54. Süsteemset mõju tuleks jälgida ka F₁-põlvkonna loomade puhul. Katse lõpetamisel võetakse paastuvereproovid iga doosirühma kümnelt juhuvalikuga leitud kohort 1A isas- ja emasloomalt kindlaksmääratud kohast; proove säilitatakse asjakohastes tingimustes ning tehakse tavaline kliinilis-biokeemiline analüüs, sealjuures määratakse kilpnäärmehormoonide T4 ja TSH sisaldus, tehakse hematoloogiline analüüs (leukotsüütide üld- ja suhtarv ning erütrotsüütide arv) ja uriinianalüüsid.
55. Liigsetele poegadele tehakse päeval PND 4 täielik lahkamine ning kaaluda tuleks kilpnäärmehormooni (T4) sisalduse mõõtmist vereseerumis. Vajaduse korral võib vastündinute (PND 4) vereproovid koondada pesakondade kaupa biokeemiliste ja kilpnäärmehormoonide analüüside tegemiseks. Hormoonide T4 ja TSH määramiseks kogutakse veri ka võõrutatud poegadelt, kellele tehakse täielik lahkamine päeval PND 22 (F₁-põlvkonna pojad, keda ei valitud kohortidesse).

Sperma näitajad

56. Sperma näitajad mõõdetakse kõikidel P-põlvkonna isasloomadel, kui 90-päevase katsega ei ole kindlaks tehtud, et uuritav kemikaal sperma näitajaid ei mõjuta. Sperma näitajad tuleks määrata kõikidel kohordi 1A isasloomadel.
57. Surmamisel registreeritakse kõikide P- ja F₁-põlvkonna (kohordi 1A) isasloomadel munandite ja munandimanuste mass. Vähemalt üks munand ja üks munandimanus säilitatakse histopatoloogiliseks uuringuks. Ülejäänud munandimanus kasutatakse munandimanuse sabas sisalduvate spermavarude määramiseks (16, 17). Lisaks kogutakse seemnerakkude kahjustamist vältivate meetoditega munandimanuse sabas või seemnejuhas olev sperma seemnerakkude liikuvuse ja morfoloogia hindamiseks (18).
58. Seemnerakkude liikuvust saab hinnata kohe pärast surmamist või hilisemaks analüüsiks säilitatud spermas. Liikumisvõimeliste seemnerakkude protsenti võib määrata subjektiivselt või objektiivselt liikumist analüüsiva arvutiprogrammiga (19, 20, 21, 22, 23, 24). Seemnerakkude morfoloogia hindamiseks tuleb munandimanusest (või seemnejuhast) võetud spermaproovi kõigepealt vaadelda fikseeritult või märgpreparaadis (25) ning iga proovi kohta vähemalt 200 spermatoosoidi tuleb klassifitseerida kas normaalseks (nii pea kui ka keskosa/saba on normaalse välimusega) või ebanormaalseks. Sperma morfoloogiliste kõrvalekallete näideteks on kokkusulamine, isoleeritud pead ning peade ja/või sabade väär moodustised (26). Väärmoodustistega või suure peaga seemnerakud võivad osutada spermatogeneesi häiretele.
59. Kui lahkamise ajal on spermaproovid külmutatud, äged fikseeritud ja seemnerakkude liikuvuse analüüs salvestatud (27), võib edasisel analüüsil piirduda kontrollrühma ja suure doosi rühma isasloomadega. Kui täheldatakse kemikaali manustamisest tingitud mõjusid, tuleks siiski hinnata ka väiksema doosi rühmasid.

▼ **M5****Täielik lahang**

60. Katse lõpetamisel või loomade enneaegse surma puhul lahatakse kõik P- ja F₁-põlvkonna loomad ning uuritakse makroskoopiliselt struktuuriliste kõrvalekallete või patoloogiliste muutuste suhtes. Erilist tähelepanu tuleks pöörata reproduktiivsüsteemi elunditele. Surmaeelses seisundis humaanselt surmatud või surnud pojad tuleks registreerida ja (kui nende laibad ei ole matsereerunud) nende laipu uurida võimalike puuete leidmiseks ja/või surmapõhjuse selgitamiseks; nende laibad tuleks säilitada.
61. Täiskasvanud P- ja F₁-põlvkonna emasloomadel uuritakse tupenõre äiet lahkamise päeval, et teha kindlaks innatsükli staadium ning leida korrelatsioonid suguelundite histopatoloogiaga. Kõikide P-emasloomade (ja F₁-põlvkonna emasloomade, kui see on kohaldatav) emakat uuritakse pesastumiskohtade olemasolu ja arvu määramiseks viisil, mis ei sega histopatoloogilist hindamist.

Elundite mass ja kudede säilitamine — täiskasvanud P- ja F₁-põlvkonna loomad

62. Katse lõpetamise ajal määratakse kõigi P-põlvkonna loomade ja kõigi täiskasvanud F₁-põlvkonna asjakohastes kohortidesse (kirjeldatud allpool) kuuluvate loomade kehamass ja kõikide allpool loetletud organite märgmass nii kiiresti kui võimalik, et vältida kuivamist. Need organid tuleks säilitada sobivates tingimustes. Kui ei ole öeldud teisiti, võib paariselundid kaaluda eraldi või koos, vastavalt katset tegeva labori tavale.

— Emakas (koos munajuhade ja emakakaelaga, munasarjad);

— munandid, munandimanused (kokku ja munandimanuse sabad, mida kasutatakse seemnerakkude loendamiseks);

— eesnääre (dorsolateraalne ja ventraalne osa koos). Eesnäärmekompleksi puhastamisel naaberkudedest tuleb hoolikalt vältida vedelikuga täidetud seemnepõiekestest vigastamist. Kui eesnäärme üldmassi määramisel tuleb nentida käsitlemise mõju, tuleb eesnäärme dorsolateraalne ja ventraalne segment pärast fikseerimist hoolikalt välja lõigata ja kaaluda eraldi;

— seemnepõiekesed koos koagulatsiooninäärmete ja nendes olevate vedelikega (tervikuna);

— aju, maks, neerud, süda, põrn, harkelund, ajuripats, kilpnääre (pärast fikseerimist), neerupealised ja teadaolevad sihtorganid või -koed.

63. Lisaks eespool loetletud elunditele tuleks võtta ja säilitada sobivates tingimustes järgmiste elundite proovid: perifeersed närvid, lihased, seljaaju, silmad ja nägemisnärv, seedetrakt, kusepõis, kopsud, hingetoru koos kilpnäärme ja kõrvakilpnäärmetega, luuüdi, seemnejuha (isasloomad), rinnanäärmed (isas- ja emasloomad) ja tupp.

64. Määratakse kõigi kohordi 1A loomade elundite mass ja elundid konserveeritakse histopatoloogiliste uuringute jaoks.

65. Sünnieelselt ja -järgselt tekitatud immuunksiliste mõjude uurimiseks kasutatakse iga doosirühma kohordist 1A 10 isas- ja 10 emaslooma (1 isas- ja 1 emasloom pesakonna kohta; iga pesakonda esindab vähemalt 1 järglane; loomad on valitud juhuslikult), kellel pärast projekti lõpetamist:

— kaalutakse manustamisviisiga seotud lümfisõlmed ja kokkupuuteteest kaugemal asetsevad lümfisõlmed (lisaks neerupealiste, harkelundi ja põrna massi määramisele, mis on tehtud juba kõikidele kohort 1A loomadele);

▼ **M5**

- tehakse põrna lümfotsüütide alampopulatsiooni analüüs (CD4+ ja CD8+ T-lümfotsüüdid, B-lümfotsüüdid ja looduslikud tapjarakud (NK-rakud); selleks kasutatakse pool põrna, teine pool põrna säilitatakse histopatoloogiliseks hindamiseks.

Immuniseerimata (kohordi 1A) loomade põrna lümfotsüütide alampopulatsioonide analüüsiga tehakse kindlaks, kas kokkupuude kemikaaliga on muutnud helperrakkude (CD4+) või tsütotoksiliste (CD8+) harkelundipäritoluga lümfotsüütide või looduslike tapjarakkude (NK-rakud) arvukust immunoloogilises püsiolekus (nimetatud rakud tagavad kiire reageerimise vähirakkudele ja haigusetekitajatele).

66. Kohort 1B loomadel tuleb kaaluda järgmised elundid ja töödelda asjaomased koed plokkpreparaatideks:

- tupp (kaalumata);
- emakas koos emakakaelaga;
- munasarjad;
- munandid (vähemalt üks);
- munandimanused;
- seemnepõiekesed koagulatsiooninäärmed;
- eesnääre;
- ajuripats;
- kindlakstehtud sihtorganid.

Kohordi 1B loomadele tehakse histopatoloogiline uuring, kui kohordi 1A tulemused on ebaselged või oletatakse reproduktiivtoksilisust või sisesekretsioonisüsteemi kahjustavaid omadusi.

67. Kohordid 2A ja 2B: arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse katsed (PND 21–22 ja täiskasvanud järglased). Kohordi 2A loomad surmatakse pärast käitumuslikke katseid, määratakse aju mass ja tehakse täielik neurohistopatoloogiline analüüs neurotoksilisuse hindamiseks. Kohordi 2B loomad surmatakse päeval PND 21 või 22, määratakse aju mass ja tehakse aju mikroskoopiline läbivaatus neurotoksilisuse hindamiseks. Kohordi 2A puhul on vajalik fikseerimine perfusiooniga; kohordi 2B loomade puhul on see valikuline, nagu on ette nähtud katsemeetodis B.53 (35).

Elundite mass ja kudede säilitamine — F₁-põlvkonna võõrutuseas loomad

68. Pojad, keda ei ole valitud kohortidesse, seejuures kängujäänud pojad, surmatakse päeval PND 22, kui tulemused ei osuta täiendava elupuhuse uurimise vajadusele. Surmatud pojad lahatakse, mille käigus hinnatakse suguorganeid, nagu on kirjeldatud punktides 62 ja 63. Iga doosirühma kummastki soost kuni 10 pojal võimalikult paljudest pesakondadest määratakse aju, põrna ja harkelundi mass ja nimetatud elundid säilitatakse sobivates tingimustes. Lisaks sellele võib osutatud isastel ja emastel poegadel säilitada rinnanäärme koed hilisemaks mikroskoopiliseks analüüsiks⁽¹⁾ (vt OECD juhenddokument nr 151 (40)). Selgelt nähtavad väärarendid ja sihtkoed tuleks säilitada võimaliku histoloogilise uuringu jaoks.

⁽¹⁾ Uuringud on näidanud, et rinnanääre, eriti varases nooruses toimuv rinnanäärme areng, on tundlik östrogeense toime näitaja. On soovitatav, et käesolevas katsemeetodis nähtaks ette noorte kummastki soost poegade rinnanäärmete uurimine pärast seda, kui see on valideeritud.

▼ M5**Histopatoloogiline uuring — P-põlvkonna loomad**

69. Kõikidel suure doosi ja kontrollrühmade P-põlvkonna loomadel tuleks teha kõikide punktides 62 ja 63 osutatud elundite täielik histopatoloogiline uuring. Kemikaaliga kokkupuutest tingitud muutustega elundeid tuleks samuti uurida kõikidel väiksema doosiga rühmade loomadel, et määrata NOAEL (tähtsamat kahjulikku toimet mitteavaldav doos). Lisaks sellele tuleks loomadel, kellel kahtlustatakse vähenenud viljakust, nt nendel, kellel ei õnnestunud paarituda, viljastuda, sigitada või sünnitada terveid järglasi, või nendel, kelle innatsükkel või sperma hulk, liikuvus või morfoloogia olid muutunud, uurida suguelundeid ning kõiki suuremaid kahjustusi tuleks hinnata histopatoloogiliselt.

Histopatoloogiline uuring — F₁-põlvkonna loomad*Kohordi 1 loomad*

70. Kõikidel suure doosi ja kontrollrühmade täiskasvanud kohordi 1A loomadel tuleks teha kõikide punktides 62 ja 63 osutatud elundite täielik histopatoloogiline uuring. Iga pesakonda peaks esindama vähemalt 1 järglane kummastki soost. Kemikaaliga kokkupuutest tingitud muutuste ja nähtavate kahjustustega elundeid ja kudesid tuleks samuti uurida kõikidel väiksema doosi rühmade loomadel, et määrata NOAEL. Selleks, et hinnata sünnieelse ja -järgse kokkupuute põhjustatud mõjusid lümfisüsteemi organitele, tuleks samuti hinnata kogutud lümfisõlmede ja luuüdi histopatoloogiat kohordi 1A 10 isas- ja 10 emasloomal, lisaks kõikidel 1A-loomadel juba tehtavatele harkelundi, põrna ja neerupealiste histopatoloogilistele hindamistele.
71. Kohordi 1B kõikide loomade suguorganite ja sisesekretsiooninäärmete kudesid, mis on töödeldud plokkpreparaadiks, nagu on kirjeldatud punktis 66, tuleks uurida histopatoloogia suhtes juhtudel, kui kahtlustatakse reproduktiivtoksilist või sisesekretsioonisüsteemi kahjustavat mõju. Kohordi 1B loomadel tuleks teha ka histoloogiline uuring, kui kohordi 1A tulemused on ebaselged.
72. Täiskasvanud emasloomade munasarjad peaksid sisaldama esmaseid ja kasvavaid folliikuleid, samuti kollaskehi; seepärast tuleks F₁-emasloomadel püüda histopatoloogilise uurimisega kvantitatiivselt hinnata esmaseid ja väikseid kasvavaid munarakke, samuti kollaskehi; loomade arv, munasarjalõigete valik ja lõikeproovi suurus peaksid statistiliselt sobima kasutatava hindamisprotseduuriga. Folliikulite loendamise võib kõigepealt teha kontrollrühma ja suure doosi rühma loomadel, ning kui viimasel juhul leitakse kahjulikku mõju, siis uurida väiksema doosi rühmi. Uurimisel tuleks arvutada esmaste folliikulite arv, millele saab liita väikeste kasvavate folliikulite arvu, et võrrelda doosirühma ja kontrollrühma kuuluvate emasloomade munasarju (vt OECD juhenddokument 151 (40)). Kollaskehade hindamine peaks toimuma paralleelselt innatsükli staadiumi määramisega, nii et tsükli staadiumi saaks hindamisel arvesse võtta. Munajuhade, emaka ja tupe puhul uuritakse vastavale organile omast arengut.
73. F₁-isasloomadel uuritakse üksikasjalikult munandite histopatoloogiat, et teha kindlaks kemikaaliga kokkupuutest tingitud mõjud kudede diferentseerumisele munandis, munandi arengule ja spermatogeneesile (38). Võimaluse korral tuleks uurida *rete testis*e lõikeid. Munandimanuse pead, keha ja saba ning seemnejuha uuritakse vastavale organile omase arengu suhtes, samuti uuritakse P-isasloomade puhul nõutavaid näitajaid.

▼ **M5***Kohordi 2 loomad*

74. Pärast neurokäitumuslike katsete lõpetamist (pärast päeva PND 75, kuid mitte hiljem kui PND 90) tehakse kõikidele suure doosi ja kontrollrühmade kohordi 2A kummastki soost loomadele neurohistopatoloogilised uuringud. Aju histopatoloogiline uuring tehakse kõikidel suure doosi ja kontrollrühmadele kuuluvatel kohordi 2B kummastki soost loomadel päeval PND 21 või 22. Kemikaaliga kokkupuutest tingitud muutustega elundeid või kudesid tuleks samuti uurida väiksema doosi rühmade loomadel, et määrata NOAEL (täheldavat kahjulikku toimet mitteavaldav doos). Kohortide 2A ja 2B loomade puhul uuritakse mitut aju lõiget, et uurida haistmissibulaid, ajukoort, hipokampi, basaalganglione, talamust, hüpotalamust, keskaju (*tectum*, *tegmentum* ja ajubarred), ajutüve ja väikeaju. Ainult kohordi 2A puhul uuritakse silmi (võrkkest ja nägemisnärv) ja perifeersete närvide, lihaste ja seljaaju proove. Kõik neurohistoloogilised määramised tehakse kooskõlas katsemeetodiga B.53 (35).
75. Morfomeetrilised (kvantitatiivsed) hindamised tuleks teha aju tüüpilistes piirkondades (usaldusväärsete mikroskoopiliste märkide järgi valitakse hoolikalt homologused lõiked) ning need hindamised võivad hõlmata konkreetsete ajupiirkondade joonmõõtmete või pindala mõõtmist. Iga iseloomuliku koha tasandilt võetakse vähemalt kolm järjestikust lõiget, et valida hindamiseks konkreetse ajuosa kõige homologsem ja tüüpilisem lõige. Neuropatoloogil peaks olema eksperdi otsustusvõimet, kui ta otsustab, kas mõõtmiseks valmistatud lõiked on homologsed muude lõigetega samade proovide hulgas ja kas neid seepärast on sobiv võtta võrdlemiseks, kuna eelkõige joonmõõtmised võivad muutuda juba väikse vahemaa juures (28). Mittehomoloogseid lõikeid ei tohiks kasutada. Kuigi eesmärk on võtta proovid kõigilt selleks ettenähtud loomadelt (10/sugu/doositase), võib piisata ka väiksemast arvust. Vähem kui 6 loomalt/sugu/doositase võetud proovidest tavaliselt siiski ei piisa käesoleva katsemeetodi puhul. Et tuvastada kemikaaliga kokkupuute mõju sellistele näitajatele nagu teatava neuroanatomilise piirkonna maht või rakkude arv, võib kasutada stereoloogiat. Koenäidiste ettevalmistamisel tuleks kõikidel etappidel — kudede perfusioon, koeproovide väljalõikamine, kudede töötlemine ja mikroskoobi-preparaatide värvimine — kasutada tasakaalustatud katsekorraldust, nii et igas partiis oleks iga doosirühma esindav valim. Kui kasutatakse morfomeetrilist või stereoloogilist analüüsi, tuleks kõikide doosirühmade ajukoed panna sobivasse fikseerivasse keskkonda samaaegselt, et vältida pikaajalisel fiksaatiivis hoidmisel ajukoe kokkutõmbumisega seotud artefakte.

UURINGU PROTOKOLL

Andmed

76. Andmed esitatakse eraldi ja tabelisse kokkuvõetuna. Iga doosirühma ja iga põlvkonna kohta tuleks võimaluse korral teatada järgmised andmed: loomade arv katse alguses, katse ajal surnuna leitud või humaanselt surmatud loomade arv, iga looma surma või humaanse surmamise aeg, viljakate loomade arv, tiinete emasloomade arv, poeginud emasloomade arv, mürgistusnähtudega loomade arv. Tuleks teatada ka mürgistuse tunnuste kirjeldus, sealhulgas avaldumise aeg, kestus ja raskus.
77. Numbrilisi tulemusi tuleks hinnata sobiva ja heakskiidetud statistilise meetodi abil; Statistilised meetodid tuleks valida juba uuringu kavandamisel ja nendega tuleks asjakohaselt arvesse võtta muid kui normaaljaotusega andmeid (nt loendusandmed), piiratud andmeid (nt piiratud vaatlusaeg), muudest andmetest sõltuvaid andmeid (nt pesakonna mõju, korduvad mõõtmised), ja ebavõrdset dispersiooni. Üldistatud lineaarsed segamudelid ning

▼ **M5**

doosi ja toime vahelise sõltuvuse mudelid hõlmavad laia klassi analüütilisi vahendeid, mis võivad olla asjakohased käesoleva katsemeetodi alusel saadud andmete töötlemisel. Protokollis tuleb esitada piisavalt teavet analüüsimeetodi kohta ja kasutatud arvutiprogrammi kohta, nii et sõltumatu kontrollija/statistik võib hinnata ja uuesti hinnata analüüsi.

Tulemuste hindamine

78. Tulemusi tuleks hinnata täheldatud mõjude suhtes, kaasa arvatud lahangu- ja mikroskoopilised leiud. Hindamisega tehakse kindlaks, kas on olemas seos doosi ja kõrvalekallete, nende esinemissageduse ja raskusastme, sealhulgas silmaga täheldatavate kahjustuste vahel või sellist seost ei ole. Hinnata tuleb ka mõju sihtorganitele, viljakusele, kliinilistele kõrvalekalletele, paljunemiskäitumisele ja pesakonna eest hoolitsemisele, kehamassi muutusi, suremust ja muid mürgistusega seotud ja arengumõjusid. Erilist tähelepanu tuleks pöörata sooga seotud muutustele. Katsetulemuste hindamisel tuleks arvesse võtta uuritava kemikaali füüsikalisi-keemilisi omadusi ja võimaluse korral toksiko-kineetilisi andmeid, sh uuritava kemikaali läbipääsemist platsentast ja eritumist piimaga.

Katseprotokoll

79. Katseprotokollis tuleks esitada järgmine teave, mis on saadud käesolevas uurimuses P-, F₁- ja F₂-loomadega (vajaduse korral).

Uuritav kemikaal:

- kogu asjakohane kättesaadav teave uuritava kemikaali ja selle keemiliste, toksiko-kineetiliste ja toksikodünaamiliste omaduste kohta;
- tunnusandmed;
- puhtus.

Kandeaine (vajaduse korral):

- kandeaine valiku põhjendamine, kui kandeaine ei ole vesi.

Katseloomad:

- kasutatud liik/aretusliin;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, sööt, pesamaterjalid jne;
- iga looma mass katse alguses;
- P-emasloomade tupeäige andmed enne kemikaali manustamise algust (kui andmeid kogutakse sel ajal);
- P-põlvkonna isas- ja emasloomade paaritamise tulemused, näidatakse isas- ja emasloom ning paaritumise edukus;
- andmed F₁-põlvkonna täiskasvanud loomade pesakonnapäritolu kohta.

Katsetingimused:

- doositaseme valimise põhjendus;
- uuritava kemikaali valmistise/söödavalmistise üksikasjad, saavutatud kontsentratsioonid;

▼ **M5**

- uuritava kemikaali stabiilsus kandeainega saadud valmistises, valmistise homogeensus (nt sööt, joogivesi), veres ja/või piimas kasutustingimustes ja säilitamisel eri kasutuskordade vahel;
- uuritava kemikaali manustamise üksikasjad;
- sööda/joogivee hulka segatud uuritava aine kontsentratsiooni (ppm) teisendus tegelikuks doosiks (mg kehamassi kg kohta päevas), vajaduse korral;
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad (sh sööda koostis, kui see on teada);
- poegade surmamiseks ja katserühmadesse määramiseks juhusliku valimise korra üksikasjalik kirjeldus;
- keskkonnatingimused;
- uuringust osavõtnute loetelu koos väljaõppe näitamisega.

Tulemused (kokkuvõte ja individuaalsed andmed sugude ja dooside kaupa):

- sööda tarbimine, vee tarbimine, kui see on teada, söödakasutuse tõhusus (kehamassi lisandumine tarbitud sööda grammi kohta, välja arvatud paaritamisperioodil ja imetamise ajal) ning uuritava kemikaali tarbimine (sööda või joogiveega manustamise puhul) P- ja F₁-põlvkonna loomade puhul;
- andmed omastamise kohta (kui on mõõdetud);
- P-loomade kehamassi andmed;
- valitud F₁-põlvkonna loomade võõrutusjärgsed kehamassi andmed;
- surmaaeg katse ajal või andmed loomade ellujäämise kohta kuni surmamiseni;
- kliiniliste leidude laad, raskus ja kestus (sõltuvalt sellest, kas kahjustused on pöörduvad või mitte);
- vereanalüüsi, uriinianalüüsi ja kliinilise keemia andmed, sealhulgas TSH ja T₄;
- põrnarakude fenotüübianalüüsi tulemused (T-, B-, NK-rakud);
- luuüdi rakuline koostis;
- mürgise toime andmed;
- P- ja F₁-põlvkonna emasloomade arv, kellel on normaalne või ebanormaalne innatsükkel ja tsükli kestus;
- aeg kuni paaritumiseni (koituseelne ajavahemik, päevade arv kokku paigutamise ja paaritumise vahel);
- toksilised või muud mõjud paljunemisele, sealhulgas selliste loomade arv ja osakaal, kellel toimus paaritumine, tiinestumine, sünnitamine ja imetamine; tiinuse esilekutsunud isasloomade arv ja osakaal, poegimisraskustega, pika või raske poegimisega emaste arv ja osakaal;
- tiinuse kestus ja, kui võimalik, poegimise kestus;
- pesastumiste arv, pesakonna suurus ja isasloomade protsent poegade hulgas;
- pärast pesastumist toimunud abortide, elussündide ja surnultsündinute arv ja protsent;

▼ **M5**

- pesakonna ja poegade massi andmed (isased, emased ja koos), kängunud järglaste arv, kui see määrati;
- selgelt nähtavate arenguhälvetega poegade arv;
- mürgistuse või muud mõjud järglastele, sünnijärgsele kasvule, elujõulisusele jne;
- andmed poegade füüsilise arengu järkude kohta ja muud sünnijärgse arengu andmed;
- F₁-põlvkonna loomade suguküpsuse saabumise andmed;
- andmed poegade ja täiskasvanud loomade funktsionaalsete leidude kohta;
- andmed P- ja täiskasvanud F₁-põlvkonna loomade kehamassi kohta surmamisel ning elundite täieliku ja suhtelise massi kohta;
- lahkamise leiud;
- kõikide histopatoloogiliste leidude üksikasjalik kirjeldus;
- P- ja F₁-põlvkonna isasloomade munandimanuse sabaosas olevate spermatoosidide koguarv, edasiliikuvate spermatoosidide protsent, morfoloogiliselt normaalsete spermatoosidide protsent ning tuvastatud kõrvalekaldega spermatoosidide protsent;
- P- ja F₁-põlvkonna emasloomade munasarjades olevate eri küpsemisstaadiumides folliikulite arvud, kui see on kohaldatav;
- F₁-põlvkonna emasloomade kollaskehade loendamise andmed;
- vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine.

Kohordi 2 näitajad:

- üksikasjalik meetodi kirjeldus: kuidas standarditi tähelepanekud ja protseduurid, samuti märgatud nähtustele hindepunktide andmise tööjuhendid;
- kõikide katses kasutatud meetodite loetelu ja nende kasutamise põhjendused;
- kõikide kasutatud käitumuslike, funktsionaalsete, patoloogia-, neurokeemia- või elektrofüsioloogiameetodite üksikasjad, sealhulgas teave automaatseadmete kohta;
- seadmete kaliibrimise meetodid, seadmete samaväärsuse tagamine ja doosirühmade tasakaalustatud jaotamine katsete tegemisel;
- lühike selgitus kõigi otsuste kohta, milles kasutati eksperdihinnanguid;
- kõikide käitumisega seotud, funktsionaalsete, neuropatoloogiliste ja morfoomeetriliste leidude üksikasjalik kirjeldus sugude kaupa, sealhulgas nii suurenemised kui ka vähenemised, võrreldes kontrollrühmadega;
- aju mass;
- neuroloogiliste tunnuste põhjal pandud diagnoosid ja oletatud kahjustused, sealhulgas looduslikult esinevad haigused või haigusseisundid;
- tüüpiliste leidude kujutised;
- madala lahutusvõimega kujutised, et oleks võimalik hinnata morfomeetriaks kasutatud lõigete homoloogsust;

▼ **M5**

- tulemuste statistiline analüüs koos andmete analüüsiks kasutatud statistiliste mudelitega ja tulemused, sõltumata sellest, kas need olid olulised või mitte;
- muude toksiliste mõjude (sugude ja doosirühmade kaupa) seos uuritud kemikaali võimaliku neurotoksilisuse kohta tehtud järeldusega;
- toksiko-kineetilise teabe mõju järeldustele;
- andmed, mis kinnitavad katsemeetodi usaldusväärsust ja tundlikkust (st positiivsed ja varasemad kontrolli andmed);
- seosed neuropatoloogilise ja funktsionaalse mõju vahel, kui on seoseid;
- NOAEL või võrdlusdoos emaloomade ja järglaste puhul, sugude ja rühmade kaupa;
- tulemustega saadud andmete üldise tõlgendamise arutelu, sealhulgas järeldus, kas uuritav kemikaal on arenguhäireid põhjustav neurotoksiline aine, ja täheldatava kahjuliku toimeta doos.

Kohordi 3 näitajad:

- seerumi IgM-antikehade tiitrid (SRBC või KLH suhtes ülitundlikkuse tekkimine) või põrna IgM PFC ühikud (SRBC suhtes ülitundlikkuse tekkimine);
- T-rakkudest sõltuva antikehareaktsiooni katse (*T-cell dependant antibody response assay*, TDAR) korrektset läbiviimist tuleks kinnitada optimeerimise protsessi osana, kui labor teeb seda katset esimest korda, ja regulaarselt (nt igal aastal) kõikide laborite puhul;
- tulemustega saadud andmete üldise tõlgendamise arutelu, sealhulgas järeldus, kas uuritav kemikaal on arenguhäireid põhjustav immuuntoksiline aine, ja täheldatava kahjuliku toimeta doos.

*Tulemuste arutelu.**Järeldused, sh NOAEL-väärtused mõjude kohta emadele ja järglastele*

Samuti tuleks esitada kogu muu teave, mida ei saadud uuringu käigus, kuid mis abistab tulemuste tõlgendamist (nt mõju sarnasus muude teadaolevalt neurotoksiliste ainete mõjuga).

Tulemuste tõlgendamine

80. Laiendatud ühe põlvkonna reproduktiivtoksilisuse uuring annab vajaduse korral teavet selle kohta, kuidas korduv kokkupuude kemikaaliga mõjutab reproduktiivtsükli kõiki etappe. Eelkõige annab uuring teavet reproduktiiv-süsteemi ja järglaste arengu, kasvu, eluvõime ja funktsionaalsete näitajate kohta kuni päevani PND 90.
81. Tulemuste tõlgendamisel tuleb arvesse võtta kogu senist teavet uuritava kemikaali kohta, sealhulgas kemikaali füüsikalisi-keemilisi, toksikokeemilisi ja -dünaamilisi omadusi, asjakohast teavet struktuurianaloogide ning varasemate mürgisuse uuringute kohta (nt äge mürgisus, korduvdoosi mürgisus, mehhaanilised uuringud ja uuringud, millega kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt hinnatakse *in vivo* ja *in vitro* metabolismi sõltuvust bioloogilisest liigist). Üldise lahangu ja elundite kaalumise tulemusi tuleks hinnata muudes, korduvate annustega uuringutes tehtud vaatluste kontekstis, kui see on teostatav. Järglaste kasvu vähenemist võib vaadelda seoses uuritava kemikaali mõjuga piima koostisele (29).

▼ **M5***Kohort 2 (arenguhäireid põhjustav neurotoksilisus)*

82. Neurokäitumuslike ja neuropatoloogilisi tulemusi tuleks tõlgendada kõikide tehtud tähelepanekute kontekstis, kasutades tõendite kaalukuse lähenemisviisi ja eksperdiarvamust. Arutada tuleks käitumuslike ja morfoloogiliste leidude tüüpe ning doosi ja toime vahelist sõltuvust. Kõnealus on arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse iseloomustuses tuleks hinnata inimeste epidemioloogilisi uuringuid või juhtumiaruandeid, katseloomade uuringuid (nt toksiko-kineetilisi andmeid, struktuuri-aktiivsuse sõltuvusi, muid toksikoloogiauringute andmeid). Andmete hindamisel tuleks arutada nii bioloogilist kui ka statistilist tähtsust. Hindamisel tuleks vaadelda neuropatoloogiliste ja käitumuslike muutuste vahelist seost, kui täheldati mingeid muutusi. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse katse tulemuste tõlgendamise suunised vt katsemeetod B.53 (35) ja Tyl *et al.*, 2008 (31).

Kohort 3 (arenguhäireid põhjustav immuuntoksilisus)

83. Immuunsüsteemi funktsiooni allasurumist või tugevdamist, mida mõõdetakse TDAR-meetodiga (T-rakkudest sõltuva antikehareaktsiooni katse), tuleks hinnata kõigi muude tähelepanekute kontekstis. TDAR-meetodi tulemuste olulisust võivad toetada muud immunoloogiaga seotud näitajad (nt luuüdi rakuline koostis, lümfikudede mass ja histopatoloogia, lümfotsüüdi-populatsioonide suhtarvud). TDAR-meetodiga kindlakstehtud mõju ei pruugi olla väga oluline, kui juba madalama doosiga kokkupuute juures esineb muid mürgistuse tunnuseid.
84. Reproduktiivtoksilisuse ja neurotoksilisuse tulemuste tõlgendamisel tuleks vaadata OECD juhenddokumenti nr 43 (26).

KIRJANDUS

- 1) Cooper, R.L., J.C. Lamb, S.M. Barlow, K. Bentley, A.M. Brady, N. Doerr, D.L. Eisenbrandt, P.A. Fenner-Crisp, R.N. Hines, L.F.H. Irvine, C.A. Kimmel, H. Koeter, A.A. Li, S.L. Makris, L.P. Sheets, G.J.A. Speijers and K.E. Whitby (2006), 'A Tiered Approach to Life Stages Testing for Agricultural Chemical Safety Assessment', *Critical Reviews in Toxicology*, 36, 69–98.
- 2) Thigpen, J.E., K.D.R. Setchell, K.B. Ahlmark, J. Locklear, T. Spahr, G.F. Leviness, M.F. Goelz, J.K. Haseman, R.R. Newbold, and D.B. Forsythe (1999), 'Phytoestrogen Content of Purified Open and Closed Formula Laboratory Animal Diets', *Lab. Anim. Sci.*, 49, 530- 536.
- 3) Zoetis, T. and I. Walls (2003), *Principles and Practices for Direct Dosing of Pre-Weaning Mammals in Toxicity Testing and Research*, ILSI Press, Washington, DC.
- 4) Moser, V.C., I. Walls and T. Zoetis (2005), 'Direct Dosing of Prewearing Rodents in Toxicity Testing and Research: Deliberations of an ILSI RSI Expert Working Group', *International Journal of Toxicology*, 24, 87–94.
- 5) Conolly, R.B., B.D. Beck, and J.I. Goodman (1999), 'Stimulating Research to Improve the Scientific Basis of Risk Assessment', *Toxicological Sciences*, 49, 1–4.
- 6) Ulbrich, B. and A.K. Palmer (1995), 'Detection of Effects on Male Reproduction — a Literature Survey', *Journal of the American College of Toxicologists*, 14, 293–327.
- 7) Mangelsdorf, I., J. Buschmann and B. Orthen (2003), 'Some Aspects Relating to the Evaluation of the Effects of Chemicals on Male Fertility', *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 37, 356–369.

▼ M5

- 8) Sakai, T., M. Takahashi, K. Mitsumori, K. Yasuhara, K. Kawashima, H. Mayahara and Y. Ohno (2000). 'Collaborative work to evaluate toxicity on male reproductive organs by repeated dose studies in rats — overview of the studies', *Journal of Toxicological Sciences*, 25, 1–21.
- 9) Creasy, D.M. (2003), 'Evaluation of Testicular Toxicology: A Synopsis and Discussion of the Recommendations Proposed by the Society of Toxicologic Pathology', *Birth Defects Research, Part B*, 68, 408–415.
- 10) Goldman, J.M., A.S. Murr, A.R. Buckalew, J.M. Ferrell and R.L. Cooper (2007), 'The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and its Utility in Toxicological Studies', *Birth Defects Research, Part B*, 80 (2), 84–97.
- 11) Sadleir, R.M.F.S. (1979), 'Cycles and Seasons', in C.R. Auston and R.V. Short (eds.), *Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization*, Cambridge, New York.
- 12) Gallavan, R.H. Jr, J.F. Holson, D.G. Stump, J.F. Knapp and V.L. Reynolds (1999), 'Interpreting the Toxicologic Significance of Alterations in Anogenital Distance: Potential for Confounding Effects of Progeny Body Weights', *Reproductive Toxicology*, 13: 383–390.
- 13) Korenbrot, C.C., I.T. Huhtaniemi and R.I. Weiner (1977), 'Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat', *Biological Reproduction*, 17, 298–303.
- 14) Ladics, G.S. (2007), 'Use of SRBC Antibody Responses for Immunotoxicity Testing', *Methods*, 41, 9–19.
- 15) Gore, E.R., J. Gower, E. Kurali, J.L. Sui, J. Bynum, D. Enmulat and D.J. Herzyk (2004), 'Primary Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rat as a Model for Immunotoxicity Evaluation', *Toxicology*, 197, 23–35.
- 16) Gray, L.E., J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott and J. Laskey (1989), 'A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat', *Fundamental and Applied Toxicology*, 12, 92–108.
- 17) Robb, G.W., R.P. Amann and G.J. Killian (1978), 'Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats', *Journal of Reproduction and Fertility*, 54, 103–107.
- 18) Klinefelter, G.R., L.E. Jr Gray and J.D. Suarez (1991), 'The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat'. *Reproductive Toxicology*, 5, 39–44.
- 19) Seed, J., R.E. Chapin, E.D. Clegg, L.A. Dostal, R.H. Foote, M.E. Hurtt, G.R. Klinefelter, S.L. Makris, S.D. Perreault, S. Schrader, D. Seyler, R. Sprando, K.A. Treinen, D.N. Veeramachaneni and L.D. Wise (1996), 'Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report', *Reproductive Toxicology*, 10, 237–244.
- 20) Chapin, R.E., R.S. Filler, D. Gulati, J.J. Heindel, D.F. Katz, C.A. Mebus, F. Obasaju, S.D. Perreault, S.R. Russell and S. Schrader (1992), 'Methods for Assessing Rat Sperm Motility', *Reproductive Toxicology*, 6, 267–273.
- 21) Klinefelter, G.R., N.L. Roberts and J.D. Suarez (1992), 'Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an *In Vitro* Demonstration', *Journal of Andrology*, 13, 409–421.
- 22) Slott, V.L., J.D. Suarez and S.D. Perreault (1991), 'Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations', *Reproductive Toxicology*, 5, 449–458.

▼ M5

- 23) Slott, V.L., and S.D. Perreault (1993), 'Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer', *Methods in Toxicology, Part A*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319–333.
- 24) Toth, G.P., J.A. Stober, E.J. Read, H. Zenick and M.K. Smith (1989), 'The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations', *Journal of Andrology*, 10, 401–415.
- 25) Linder, R.E., L.F. Strader, V.L. Slott and J.D. Suarez (1992), 'Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants', *Reproductive Toxicology*, 6, 491–505.
- 26) OECD (2008), *Guidance Document on Mammalian Reproductive Toxicity Testing and Assessment*, Series on Testing and Assessment, No. 43, ENV/JM/MONO(2008)16, OECD, Paris.
- 27) Working, P.K., M. Hurtt (1987), 'Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility', *Journal of Andrology*, 8, 330–337.
- 28) Bolin, B., R. Garman, K. Jensen, G. Krinke, B. Stuart, and an ad Hoc Working Group of the STP Scientific and Regulatory Policy Committee (2006), 'A "Best Practices" Approach to Neuropathologic Assessment in Developmental Neurotoxicity Testing — for Today', *Toxicological Pathology*, 34, 296–313.
- 29) Stütz, N., B. Bongiovanni, M. Rassetto, A. Ferri, A.M. Evangelista de Duffard, and R. Duffard (2006), 'Detection of 2,4-dichlorophenoxyacetic Acid in Rat Milk of Dams Exposed During Lactation and Milk Analysis of their Major Components', *Food Chemicals Toxicology*, 44, 8–16.
- 30) Thigpen, JE, K.D.R. Setchell, J.K. Haseman, H.E. Saunders, G.F. Cavinness, G.E. Kissling, M.G. Grant and D.B. Forsythe (2007), 'Variations in Phytoestrogen Content between Different Mill Dates of the Same Diet Produces Significant Differences in the Time of Vaginal Opening in CD-1 Mice and F344 Rats but not in CD Sprague Dawley Rats', *Environmental health perspectives*, 115(12), 1717-1726.
- 31) Tyl, R.W., K. Crofton, A. Moretto, V. Moser, L.P. Sheets and T.J. Sobotka (2008), 'Identification and Interpretation of Developmental Neurotoxicity Effects: a Report from the ILSI Research Foundation/Risk Science Institute Expert Working Group on Neurodevelopmental Endpoints', *Neurotoxicology and Teratology*, 30: 349–381.
- 32) OECD (1996), *Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*, OECD Guideline for Testing of Chemicals, No. 422, OECD, Paris.
- 33) Käesoleva lisa peatükk B.43. Neurotoksilisuse uuring närilistel.
- 34) OECD (2000), *Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluations*, Series on Testing and Assessment, No. 19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- 35) Käesoleva lisa peatükk B.53. Arenguhäireid põhjustava neurotoksilisuse uuring.
- 36) Käesoleva lisa peatükk B.54. Uterotroofne biokatse närilistel: kiire söelkatse östrogeensete omaduste väljaselgitamiseks.
- 37) Käesoleva lisa peatükk B.55. Hershbergeri biokatse rottidel: kiire söelkatse (anti)androgeensete omaduste väljaselgitamiseks

▼ M5

- 38) OECD (2009), Guidance Document for Histologic Evaluation of Endocrine and Reproductive Test in Rodents, Series on Testing and Assessment, No. 106, OECD, Paris.
- 39) OECD (2011), Guidance Document on the Current Implementation of Internal Triggers in the Extended One Generation Reproductive Toxicity Study in the United States and Canada, Series on Testing and Assessment, No. 117, ENV/JM/MONO(2011)21, OECD, Paris.
- 40) OECD (2013), Guidance Document supporting TG 443: Extended One Generation Reproductive Toxicity Study, Series on Testing and Assessment, No. 151, OECD, Paris.

▼ **M5***1. liide***Mõõtmised ja vaatlused, mis kuuluvad funktsionaalvaatluste kompleksi (kohort 2A)**

Kodupuur ja avamaa	Manipuleerimiskatsed	Füsioloogilised näitajad
Asend	Äravõtmise kergus	Temperatuur
Tahtmatud kloonilised ja toonilised krambid	Kättevõtmise kergus	Kehamass
Silmade sulgemine	Lihaste toonus	Pupilli reaktsioon
Turris karv	Reaktsioon lähenemisele	Pupilli suurus
Süljevool	Reaktsioon puudutusele	
Pisaravool	Helisignaali reageerimine	
Häälitsused	Reaktsioon saba näpistamisele	
Järglaste hooldamine	Reaktsioon asendi muutmisele	
Kõnnaku kõrvalekalded	Tagajalgade laialiajamine kukutamisel	
Erutus	Esikäpa haardetugevus	
Stereotüüpne käitumine	Tagakäpa haardetugevus	
Kummaline käitumine		
Määrumine		
Hingamise kõrvalekalded		

▼ **M5**

2. liide

MÕISTED

Kemikaal – aine või segu.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼M5

B.57. H295R STEROIDOGENEESI KATSE

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 456 (2011). OECD algatas 1998. aastal prioriteetse tegevussuunana olemasolevate katsejuhendite läbivaatamise ja uute väljatöötamise, et sõeluuringutega selgitada välja võimalikud sisesekretsioonisüsteemi kahjustajad ja katsetada neid. OECD 2002. aasta kontseptuaalses raamistikus sisesekretsioonisüsteemi kahjustavate kemikaalide katsetamiseks ja hindamiseks on viis taset; igale tasemele vastab erinev bioloogilise keerukuse tase (1). Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud *in vitro* H295R-steroidogeneesi katse (H295R) on kasutatud inimese neerupearilisevähi rakuliini (NCI-H295R-rakud) ja see vastab 2. taseme „*in vitro* katsele, millega saadakse mehhanistlike andmeid”, mida kasutatakse sõelumiseks ja selleks, et tunnistada kemikaal erilist tähelepanu nõudvaks. Katse väljatöötamine ja standardimine sõelkatseks, mille abil saaks avastada kemikaalide poolt steroidogeneesi, eriti 17 β -östradioli (E2) and testosterooni (T) sünteesile avaldatavat mõju, toimus mitmeastmelise protsessina. H295R-katse on optimeeritud ja valideeritud (2, 3, 4, 5).
2. H295R steroidogeneesi katse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis mõjutavad E2 ja T sünteesi. H295R-katse on ette nähtud selliste ksenobiootikute leidmiseks, mis mõjutavad raku endogeenseid komponente, millest koosneb kolesteroolist E2 ja/või T sünteesini viiv rakusisene biokeemiline sünteesirada. H295R-katse ei ole ette nähtud selliste kemikaalide kindlakstegemiseks, mis mõjutavad steroidogeneesi hüpotalamuse-ajuripatsisugunäärmete (HAS) telje kaudu. Katse eesmärk on saada vastus JAH või EI küsimusele, kas kemikaal võib esile kutsuda või pärssida T ja E2 sünteesi; mõnel juhul võib saada aga ka kvantitatiivse tulemuse (vt punktid 53 ja 54). Katse tulemused väljendatakse hormoonide sünteesi suhteliste muutustena, võrreldes lahusti kontrolliga. Katse eesmärk ei ole saada konkreetset mehhanismi käsitlevat teavet, kuidas uuritav kemikaal mõjutab sisesekretsioonisüsteemi. Teadlased on uurinud kõnealuse rakuliini abil mõju konkreetsetele ensüümidele ja vahepealsete hormoonide nagu progesterooni sünteesile (2).
3. Käesolevas katsemeetodis kasutatud mõisted ja lühendid on esitatud liites. Üksikasjalik katse-eeskiri, kuidas valmistada lahuseid, kasvatada rakke ja teha muid katse läbiviimiseks vajalikke töid, on esitatud OECD dokumendi 'Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production' (4) I–III liites.

LÄHTEKAALUTLUSED JA PIIRANGUD

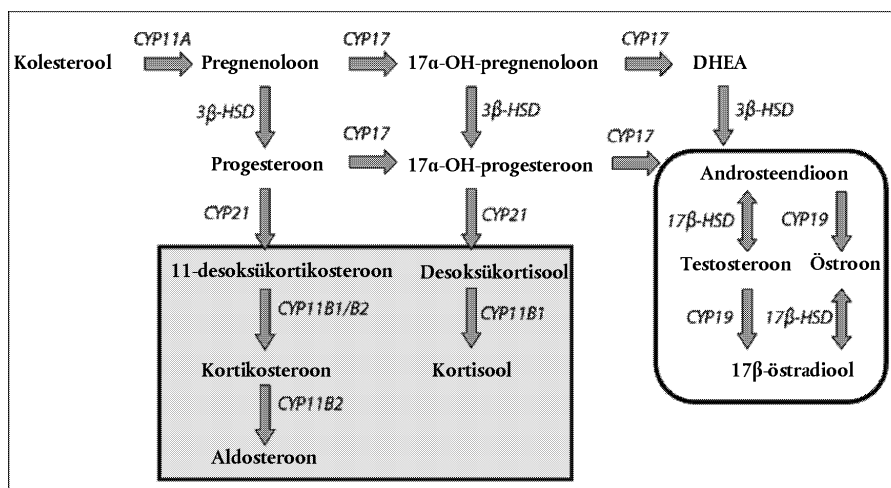
4. Steroidsete suguhormoonide sünteesis osalevad viis ensüümi, mis katalüüsivad kuue steroidse suguhormooni biosünteesi. Kolesterooli ensümaatilise muundamine pregnenoloniks kolesterooli kõrvalahelat lõhustava tsütokroom P450 (CYP) ensüümi (CYP11A) poolt on steroidsete lõppsadusteni viiva biokeemiliste reaktsioonide rea esimene etapp. Olenevalt kahe järgmise reaktsiooni järgust hargneb steroidogeneenirada kaheks rajaks, need on Δ^5 -hüdroksüsteroidide rada ja Δ^4 -ketosteroidide rada, mis ühinevad taas androsteendiooni sünteesi juures (joonis 1).
5. Androsteendioon muudetakse 17 β -hüdroksüsteroiddehüdrogenaasi (17 β -HSD) poolt testosterooniks (T). Testosteroon on nii vahesaadus kui ka lõpphormoonsaadus. Isaslooma organismis võib 5 α -reduktaas muundada testosterooni (T) dihidrotestosterooniks (DHT); 5 α -reduktaasi leidub androgeenide sihtkudedes, nagu eesnääre ja seemnepõiekesed, rakumembraanides, tuumaümbrises ja endoplasmaatilises retiikulis. DHT on oluliselt tugevam androgeen kui T ja seda peetakse samuti lõpphormoonsaaduseks. H295R-katse abil ei mõodeta DHT-d (vt punkt 10).

▼ M5

6. Steroidogeense raja ensüüm, mis muundab androgeensed kemikaalid östrogeenseteks kemikaalideks, on aromataas (CYP19). CYP19 muundab testosterooni (T) 17 β -östradiooliks (E2) ja androsteendiooni östrooniks. Hormoon E2 ja T peetakse steroidogeense raja lõppsaadusteks.
7. CYP17 lüaasse aktiivsuse spetsiifilisus vahepealsete substraatide suhtes on loomaliigist. Inimesel eelistab see ensüüm Δ^5 -hüdroksüsteroidse raja substraate (pregnenolooni), samal ajal kui roti puhul on eelistatud Δ^4 -ketosteroidse raja substraadid (progesteron) (19). Sellised erinevused CYP17 lüaasses aktiivsuses võivad selgitada mõningaid liigist sõltuvaid erinevusi *in vivo*-reaktsioonis steroidogeneesi mõjutavatele kemikaalidele (6). On näidatud, et H295R-rakud peegeldavad väga hästi täiskasvanud inimese neerupealise ensüümide ekspresiooni ja steroidide sünteesi (20), kuid nendes on ekspresseeritud androgeenide sünteesi nii Δ^5 -hüdroksüsteroidse kui ka Δ^4 -ketosteroidse raja ensüümid (7, 11, 13, 15).

Joonis 1

Steroidogeenne rada H295R-rakkudes



Märkus

Ensüümid on esitatud kaldkirjas, hormoonid on paksus kirjas ja nooled näitavad sünteesi suunda. Halli taustaga on näidatud kortikosteroidseid rajad ja saadused. Steroidsete suguhormoonide rajad ja saadused on ümbritsetud ringiga. CYP = tsütokroom P450; HSD = hüdroksüsteroiddehüdrogenaas; DHEA = dehidroepiandrosteron.

8. Inimese H295R-adrenokartsinoomi rakud on kasulik *in vitro* mudel steroidhormoonide sünteesile avaldatava mõju uurimiseks (2, 7, 8, 9, 10). H295R-rakkudes on ekspresseeritud geenid, milles on kodeeritud eespool steroidogeneesi jaoks olulised ensüümid (11, 15) (joonis 1). See on unikaalne omadus, kuna nende geenide *in vivo* ekspressioon sõltub koest ja arengustaadiumist; tavaliselt ei ole üheski koest ega üheski arengustaadiumis ekspresseeritud kõik steroidogeneesis osalevad geenid (2). H295R-rakkudel on inimloote tsonaalselt diferentseerumata neerupealiserakkude omadused (11). Need rakud kujutavad endast ainulaadset *in vitro*-süsteemi, kuna nad on suutelised sünteesima kõiki täiskasvanute neerupealise koore ja sugunäärmetes leiduvaid steroidhormoone ning see võimaldab uurida mõju nii kortikosteroidide sünteesile kui ka steroidsete suguhormoonide nagu androgeenide ja östrogeenide sünteesile, kui katse on valideeritud ainult T ja E2 määramiseks. Katsesüsteemiga kindlakstehtud T ja E2 sünteesi muutuste põhjuseks võivad olla uuritava kemikaali mitmesugused mõjud steroidogeneesetele funktsioonidele, mis on ekspresseeritud H295R-rakkudes. Need hõlmavad mõju steroidhormoonide sünteesis, muundamises või kõrvaldamises osalevate ensüümide ekspressioonile, sünteesile või funktsioonidele (12, 13, 14). Hormoonide sünteesi pidurdamist võib põhjustada otsene

▼ **M5**

konkurents sünteesiraja ensüümile sidumise pärast, mõju sellistele kofaktoritele nagu NADPH (nikotiinamiidadeniindinukleotiidfosfaat) ja cAMP (tsükline adenosiinmonofosfaat) ja/või steroidide metabolismi kiirendamine või steroidogeneesi raja mõne ensüümi geeni ekspressiooni allasurumine. Kui sünteesi pidurdamist võib põhjustada hormoonisünteesis osalevate protsesside otsene või kaudne mõjutamine, siis sünteesi indutseerimine on tavaliselt seotud kaudse mõjuga, nagu kofaktorite (nt NADPH, cAMP) mõjutamine (see toimub forskoliini puhul), steroidide metabolismi vähendamine (13) ja/või steroidogeenide geenide ekspressiooni suurendamine.

9. H295R-katsel on rida eeliseid:

— see võimaldab kindlaks teha nii T ja E2 sünteesi suurenemist kui ka vähenemist;

— see võimaldab otse hinnata kemikaali võimalikku mõju raku eluvõimele või tsütotoksilisust. See on oluline, kuna see võimaldab eristada tsütotoksilisusest tingitud mõju sellisest mõjust, mis tuleneb kemikaalide otsesest toimest steroidogeenidele radadele; selline eristamine ei ole võimalik koeeksplantaatide korral, milles on palju eri tundlikkuse ja eri funktsioonidega rakutüüpe;

— meetod ei nõua loomade kasutamist;

— rakuliin H295R on kaubanduslikult kättesaadav.

10. Katsemeetodi peamised piirangud on järgmised:

— rakkude metaboliseerimisvõime ei ole teada, kuid on tõenäoliselt üsna piiratud; seepärast jäävad selle katsega tõenäoliselt avastamata kemikaalid, mida on vaja metabolismi kaudu aktiveerida;

— kuna H295R-rakud on saadud neerupealiste koest, on neis olemas ensüümid, mis võivad sünteesida glüko- ja mineraalkortikoide, samuti suguhormoone; seetõttu võib mõju glüko- ja mineraalkortikoidide sünteesile mõjutada katses täheldatavat T ja E2 taset;

— katsega ei saa määrata DHTd ja sellepärast ei saa määrata kemikaale, mis pidurdavad 5 α -reduktaasi; sellisel juhul võib kasutada Hershbergeri katset (16);

— H295R-katsega ei saa avastada kemikaale, mis segavad steroidogeneesi hüpotalamuse-ajuripatsi-sugunäärmete (HAS-) telje kaudu; seda omadust saab uurida ainult elusloomadel tehtavate katsetega.

KATSE PÕHIMÕTE

11. Katse eesmärk on teha kindlaks kemikaalid, mis mõjutavad T ja E2 sünteesi. T on E2 sünteesi rajal ühtlasi üks vaheühendeid. Katsega saab kindlaks teha kemikaale, mis tavaliselt pidurdavad steroidogeneesi raja ensüüme.

▼ M5

12. Katse tehakse tavaliselt standardse rakukultuuri tingimustes 24 süvendiga plaatidel. Katse tegemiseks võib kasutada ka muu suurusega plaate; sellisel juhul tuleb külvamist ja katsetingimusi siiski vastavalt kohandada, et järgida tulemuslikkuse kriteeriume.
13. Pärast 24-tunnist kohanemisperioodi süvenditega plaatidel viiakse rakud 48 tunniks kokkupuutesse uuritava kemikaali seitsme kontsentratsiooniga (vähemalt kolm paralleelkatset). Paralleelselt tehakse katsed lahusti ja teada oleva pidurdaja või aktiveerija ühe kindla kontsentratsiooniga; need on negatiivne ja positiivne kontroll. Kokkupuuteperioodi lõpus eemaldatakse igast süvendist katsekeskkond. Rakkude elujõulisust igas süvendis kontrollitakse kohe pärast katsekeskkonna eemaldamist. Hormoonide keskmist kontsentratsiooni katsekeskkonnas saab mõõta eri meetoditega; võib kasutada müügil olevaid hormoonide mõõtmise komplekte ja/või kasutada instrumentaalseid meetodeid, näiteks vedelikkromatograafia-mass-spektrometriat (LC-MS). Andmed väljendatakse suhtelise muutusena (kordades), võrreldes muutust lahusti kontrolli ja vähima täheldatavat toimet avaldava kontsentratsiooniga (*lowest-observed-effect-concentration*, LOEC). Kui katse tulemus on negatiivne, teatatakse kõrgeim uuritud kontsentratsioon kui täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (*no-observed-effect-concentration*, NOEC). Järeldus kemikaali võime kohta mõjutada steroidogeneesi peaks põhinema vähemalt kahel teineteisest sõltumatul katsel. Esimese katse võib teha doosivahemiku otsimise katsena, edaspidi kohandatakse katsetes 2 ja 3 (kui need tehakse) kontsentratsioone, kui tekivad raskused lahustuvuse ja tsütotoksilisusega või kui kemikaali toime hakkab avalduma alles uuritud kontsentratsioonide vahemiku äärel.

RAKUKULTUURI KASVATAMINE

Rakuliin

14. NCI-H295R-rakke saab osta Ameerika rakukultuuride kollektsioonist (American Type Culture Collections, ATCC) materjali üleandmise lepingu (*Material Transfer Agreement*, MTA)⁽¹⁾ allakirjutamisel.

Sissejuhatus

15. Kuna rakkude võime toota E2 muutub rakkude vanuse või passaažide arvu suurenemisega (2), tuleks rakke enne nende kasutamist kasvatada teatavate eeskirjade järgi, ning üles tuleks märkida passaažide arv pärast rakkude ülessulatamist ja passaaži number, mille juures rakud külmutati ja pandi vedelasse lämmastikku. Esimene number on tegelik rakupassaaži number ja teine number näitab rakupassaaži, milles rakud külmutati ja pandi hoiule. Näiteks rakud, mis külmutati pärast viiendat passaaži ning sulatati ja seejärel eraldati aluselt kolm korda (4 passaaži, kui loeme värskest sulatatud rakud passaažiks 1) pärast seda, kui neid oli jälle kasvatatud, saavad märgise 4.5. Nummerdamisskeemi kohta on esitatud näide valideerimisaruande I liites (4).
16. Säilituskeskkonda kasutatakse täiendatud keskkonna ja külmutamiskesk-konna alusena. Täiendatud keskkond on rakkude kasvatamise vajalik komponent. Külmutamiskesk-kond on spetsiaalselt välja töötatud selleks, et rakke saaks kahjustamatult külmutada pikaajaliseks säilitamiseks. Enne kasutamist tuleks Nu-seerumit (vm sarnaste omadustega seerumit, mille kohta on näidatud, et see vastab katse tegemise ja kvaliteedikontrolli nõuetele), mis on lisatud keskkonna osa, analüüsida, et teha kindlaks T ja E2 taustkontsentratsioon. Nende lahuste valmistamist on kirjeldatud valideerimisaruande II liites (4).

⁽¹⁾ ATCC CRL-2128; ATCC, Manassas, VA, USA (<http://www.lgcstandards-atcc.org/>).

▼M5

17. Pärast H295R-rakkude kultuuri alustamist ATCC-originaalpartiist tuleb rakke kasvatada viie passaaži jooksul (st rakke eraldatakse aluselt 4 korda). Viienda passaaži rakud külmutatakse seejärel säilitamiseks vedelas lämmastikus. Enne rakkude külmutamist kasvatatakse eelmise, neljanda passaaži rakke kvaliteedikontrolli plaadil (vt punktid 36 ja 37), millega kontrollitakse, et hormoonide baasproduksioon ja reageering positiivse kontrolli kemikaalidele vastaksid katse kvaliteedikontrolli kriteeriumidele, mis on esitatud tabelis 5.
18. H295R-rakke tuleb kasvatada, külmutada ja hoida vedelas lämmastikus selle tagamiseks, et alati on kättesaadavad vajaliku passaaži/vajalikus vanuses rakud kasvatamiseks ja kasutamiseks. H295R-katse puhul lubatav passaažide maksimaalne arv pärast uue ⁽¹⁾ või külmutatud ⁽²⁾ rakupartii kultuuri võtmist ei tohiks olla üle 10. Näiteks sobivad rakukultuuride passaažid, mis on võetud 5. passaažis külmutatud partiist, on 4.5 kuni 10.5. Külmutatud partiist alustatud rakukultuuri puhul tuleb järgida punktis 19 kirjeldatud korda. Neid rakke tuleks kasvatada vähemalt neljas (4) täiendavas passaažis (passaaž 4.5), enne kui neid kasutatakse katses.

Rakkude võtmine külmutatud varukultuurist

19. Rakkude külmutatud varukultuurist võtmise korda tuleb kasutada siis, kui uus partii rakke võetakse välja vedela lämmastikuga hoidlast kasvatamiseks ja katses kasutamiseks. Toimimise üksikasjad on esitatud valideerimisuuringu III liites (4). Rakud eemaldatakse vedela lämmastikuga hoidlast, sulatatakse kiiresti, pannakse tsentrifuugitopsis olevasse täiendatud keskkonda, tsentrifuugitakse toatemperatuuril, suspendeeritakse uuesti täiendatud keskkonnas ja viiakse üle kultuurikolbi. Keskkonda tuleks järgmisel päeval vahetada. H295R-rakke kasvatatakse inkubaatoris 37 °C juures õhuatmosfääris, mis sisaldab 5 % CO₂, ja keskkonda uuendatakse 2–3 korda nädalas. Kui rakukultuur saavutab ligikaudu 85–90 % laatumise (konfluentsuse), tuleb kultuur eraldada aluselt. Rakkude aluselt eraldamine on vajalik nende tervise ja kasvu tagamiseks, et need oleksid biokatse tegemiseks vajalikus seisundis. Rakke loputatakse kolm korda fosfaatpuhvit sisaldava soolalahusega (mis ei sisalda Ca²⁺ ega Mg²⁺) ja vabastatakse rakud kultuurikolvist, milleks lisatakse sobivat ensüümi, mis aitab rakkudel eralduda, nt trüpsiiniga fosfaatpuhvit sisaldava soolalahusega (mis ei sisalda Ca²⁺ ega Mg²⁺). Kohe pärast rakkude eraldumist kultuurikolvist tuleks ensüümi toime peatada, milleks lisatakse kolm korda suurem kogus täiendatud keskkonda, kui selle lahuse maht, mida kasutati ensüümiga töötlemisel. Rakud viiakse üle tsentrifuugitopsi, tsentrifuugitakse toatemperatuuril, supernatant eemaldatakse ja tsentrifuugitud rakukogum suspendeeritakse uuesti täiendatud keskkonnas. Sobiv kogus rakkudega lahust pannakse uude kultuurikolbi. Rakkudega lahuse kogus tuleks reguleerida selliseks, et rakud laatuva 5–7 päevaga. Soovitav alamkultuuri suhtarv on 1: 3 kuni 1: 4. Tass tuleks hoolikalt märgistada. Rakud on nüüd valmis katses kasutamiseks ja liigsed rakud tuleks külmutada vedelas lämmastikus, nagu on kirjeldatud punktis 20.

⁽¹⁾ „Uus partii” — uus rakkude partii, mis on saanud ATCC-lt.

⁽²⁾ „Külmutatud partii” — rakke on varem kasvatatud ja siis külmutatud mujal kui ATCC-s.

▼ **M5****H295R-rakkude külmutamine (rakkude ettevalmistamine vedelas lämmastikus säilitamiseks)**

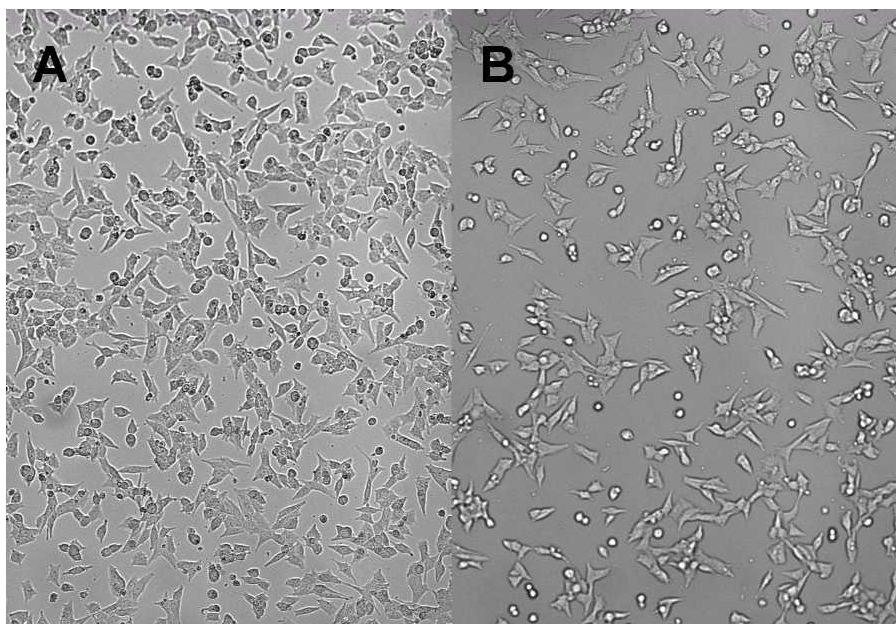
20. H295R-rakkude ettevalmistamisel külmutamiseks tuleks korrata eespool kirjeldatud rakkude eraldamisel kasutatud korda kuni tsentrifuugitopsi põhja kogutud rakkude uuesti suspendeerimiseni. Seekord suspendeeritakse tsentrifuugitud rakkudekogum külmutamiskeskonnas. Rakkudega lahuse viiakse üle krüoviaali, märgistatakse, nagu vaja, ja külmutatakse 24 tundi – 80 °C juures, mille järel vial pannakse hoiule vedelasse lämmastikku. Toimimise üksikasjad on esitatud valideerimisuringu III liites (4).

Rakkude kandmine plaadile ja eelinkubeerimine katse tegemiseks

21. Katse tegemiseks vajalike punktis 19 esitatud juhendite kohaselt ettevalmistatud 24 süvendiga plaatide arv sõltub uuritavate kemikaalide arvust ja rakkude laatumisest kultuurikolvist. Üldreeglina saab ühest kultuurikolvist (75 cm²), milles laatumismäär on 80–90 %, piisava hulga rakke 1,5 (24 süvendiga) plaadi jaoks, kui vajalik rakkude tihedus on 200 000 kuni 300 000 rakku keskkonna ml-s, mis tekitab umbes 50–60 % laatumise süvendites 24 tunniga (joonis 2). See on tavaliselt sobivaim rakkude tihedus katstes hormoonide sünteesiks. Suurema tiheduse juures muutub T ja ka E2 sünteesi ajaline käik. Enne katse esmakordset tegemist soovitatakse katsetada mitut külvamistihedust vahemikus 200 000 kuni 300 000 rakku ml-s ja edasisteks katseteks tuleks valida selline tihedus, mis annab 50–60 % laatumise süvendites 24 tunniga.

Joonis 2

**H295R-rakkude mikrofoto külvamistihedusel 50 % 24 süvendiga plaadil pärast 24 tundi:
A — süvendi äärel; B — süvendi keskel**



22. Keskkond eemaldatakse kultuurikolvist pipetiga ja rakke loputatakse 3 korda steriilse fosfaatpuhvrit sisaldava soolalahusega (mis ei sisalda Ca²⁺ ega Mg²⁺). Lisatakse ensüümi lahust samas fosfaatpuhvrit sisaldavas soolalahuses, et eraldada rakud kultuurikolvist. Rakkude eraldumiseks sobiva aja järel tuleks ensüümi toime peatada, milleks lisatakse kolm korda kogus täiendatud keskkonda, kui selle lahuse maht, mida kasutati ensüümiga töötlemisel. Rakud viiakse üle tsentrifuugitopsi, tsentrifuugitakse toatemperatuuril, supernatant eemaldatakse ja tsentrifuugitud rakkudekogum suspendeeritakse uuesti täiendatud keskkonnas. Arvutatakse rakkude tihedus, kasutades näiteks hematotsütomeetrit või rakuloendajat. Rakkudega lahust tuleks

▼ **M5**

lahjendada kuni vajaliku külvamistiheduseni ja segada hoolikalt, et tagada rakkude ühtlane tihedus. Rakud tuleks kanda plaadile, 1 ml rakkudega lahust igasse süvendisse, ning plaadid ja süvendid märgistatakse. Rakkudega plaate inkubeeritakse 24 tundi 37 °C juures õhuatmosfääris, mis sisaldab 5 % CO₂, et lasta rakkudel kinnituda süvenditele.

KVALITEEDIKONTROLLI NÕUDED

23. On väga oluline, et süvenditesse pandaks täpne maht lahuseid ja dooside lisamisel proove, kuna need mahud määravad kontsentratsioonid, mida kasutatakse katsetulemuste arvutamisel.
24. Enne rakukultuuri loomist ja edasist katsete tegemist peaks iga labor näitama, et tema hormoonide määramise süsteem on piisavalt tundlik (punktid 29–31).
25. Kui hormoonide määramiseks kasutatakse antikehapõhiseid katseid, tuleks enne katse alustamist kontrollida, kas uuritavad kemikaalid võivad segada T ja E2 mõõtmist vastavalt punktis 32 kirjeldatule.
26. Katse puhul soovitatakse lahustina kasutada dimetüülsulfoksiidi (DMSO). Kui kasutatakse muud lahustit, tuleks määrata:

— uuritava kemikaali, forskoliini ja prokloraasi lahustuvus selles lahustis ning

— tsütotoksilisus funktsioonina lahusti kontsentratsioonist.

Soovitatakse, et lahusti suurim lubatav kontsentratsioon ei oleks kõrgem kui solvendi madalaima tsütotoksilise kontsentratsiooni 10-kordne lahjendus.

27. Enne katse esmakordset tegemist peaks labor läbi tegema kvalifikatsioonikatse, mis näitab, et labor suudab hooldada rakukultuuri ning saavutada rakukultuuri ja eksperimenditingimused, mis on vajalikud kemikaali katsetamiseks, nagu on kirjeldatud punktides 33–35.
28. Katsete alustamisel uue partiiga tuleks enne uue partii rakkude kasutamist teha katse kontrollplaadiga, et hinnata rakkude toimimist, nagu on kirjeldatud punktides 36 ja 37.

Hormoonide määramise süsteemi toimimine

Meetodi tundlikkus, mõõtetäpsus ja kordustäpsus ning ristreaktsioonid proovi maatriksiga

29. Iga labor võib ise valida hormoonide mõõtmise süsteemi, mida ta kasutab H295R poolt sünteesitud T ja E2 määramiseks, tingimusele, et see vastab tulemuslikkuse kriteeriumidele, sealjuures mõõtmispiirile (*Limit of Quantification*, LOQ). Nominaalselt on need 100 pg/ml T puhul ja 10 pg/ml E2 puhul; väärtused põhinevad valideerimisuringus leitud normaalsetel hormoonitaseme baasväärtustel. Kuid ka kõrgem või madalam tase võib olla sobiv; see oleneb hormoonide baastasemest, mis on määratud katsete tegevus laboris. Enne edikontrolli plaadi ja uuritava kemikaali katsete käivitamist peaks labor tõendama, et kasutatava hormoonide määramise katsega saab hormoonide kontsentratsiooni mõõta täiendatud keskkonnas piisava mõõtmis- ja kordustäpsusega, et täita tabelites 1 ja 5 esitatud kvaliteedikontrolli kriteeriumid; selleks analüüsitakse täiendatud keskkonda, mida on tembitud hormooni sisestandardiga. Täiendatud keskkonda peaks olema

▼ **M5**

tembitud kummagi hormooniga vähemalt kolmel kontsentratsioonil (nt 100, 500 ja 2 500 pg/ml T-d; 10, 50 ja 250 pg/ml E2; T ja E2-ga tempimise kõige madalama määranaga võib kasutada ka kõige madalamaid võimalikke kontsentratsioone, arvestades valitud hormoonide määramise süsteemi avastamispiiri) ja need tuleks määrata. Ekstraheerimata proovides mõõdetud hormoonide kontsentratsioonid tohivad nominaalsest kontsentratsioonist erineda kuni 30 % ja sama proovi paralleelmõõtmiste erinevus ei tohiks olla üle 25 % (vt ka tabel 8, täiendavad kvaliteedikontrolli kriteeriumid). Kui need kvaliteedikontrolli kriteeriumid on täidetud, siis eeldatakse, et valitud hormoonide määramise süsteem on piisavalt täpne, korratav ja ei esine ristreaktsioone keskkonnaga (proovi maatriks), mis võiksid oluliselt mõjutada katse tulemust. Sellisel juhul ei ole enne hormoonide mõõtmist vaja proove ekstraheerida.

30. Kui tabelites 1 ja 8 esitatud kvaliteedikontrolli kriteeriumid ei ole täidetud, võib olla tegemist olulise maatriksiefektiga; sel juhul tuleb teha katse tembitud keskkonnaga ja ekstraheerida hormoonid. Ekstraheerimise käigu kohta on esitatud näide valideerimisaruande II liites (4). Hormoonide kontsentratsiooni mõõtmisel ekstraheeritud proovidest tuleks teha kolm paralleelkatset⁽¹⁾. Kui on võimalik näidata, et pärast ekstraheerimist keskkonna komponendid ei sega hormoonide määramise meetodit, nagu on määratletud kvaliteedikontrolli kriteeriumidega, tuleks kõik edaspidised katsed teha ekstraheeritud proovidega. Kui pärast ekstraheerimist ei õnnestu kvaliteedikontrolli kriteeriume täita, siis ei ole kasutatav hormoonide määramise süsteem sobiv H295R steroidogeneesi katses kasutamiseks ja tuleb kasutada muud hormoonide määramise meetodit.

Standardkõver

31. Lahusti kontrolli katsetest määratavad hormoonide kontsentratsioonid peaksid olema standardkõvera lineaarse osa peal. Eelistatavalt peaksid lahusti kontrolli tulemused asuma lineaarse osa keskel, mis tõendaks, et on võimalik mõõta nii hormoonisünteesi pärssimist kui ka aktiveerimist. Vastavalt sellele tuleks valida keskkonna (või ekstraktide) lahjendused, mis tehakse enne mõõtmist. Lineaarne sõltuvus määratakse kindlaks sobiva statistilise meetodiga.

Kemikaali häiriva mõju katse

32. Kui hormoonide määramiseks kasutatakse antikeha-põhiseid meetodeid nagu ensüümmuunsorptsioonanalüüs (ELISA) ja radioimmuunanalüüs (RIA), tuleks enne kemikaalidega tegelike katsete tegemist kontrollida kemikaalide võimalikku segavat mõju (valideerimisaruande III liide (4)), kuna mõni kemikaal võib neid katseid segada (17). Kui esineb segamine, mis on $\geq 20\%$ hormoonide T ja/või E2 baastasemest, mis määratakse hormoonianalüüsiga, tuleb kõigi uuritavate kemikaalide varulahuse lahjendustega teha hormoonide analüüsile kemikaali poolt avaldatava segava mõju

⁽¹⁾ Märkus: kui on vajalik ekstraheerimine, tehakse iga ekstraktiga kolm paralleelset määramist. Iga proovi ekstraheeritakse ainult üks kord.

▼ **M5**

katse (nagu on kirjeldatud valideerimisaruande (4) III liites, jaotis 5.0), et teha kindlaks lävidoos, mille juures esineb oluline ($\geq 20\%$) segamine. Kui segamine on alla 30 %, võib segamise arvestamiseks viia tulemusse sisse parandi. Kui segamine on üle 30 %, on andmed kõlbatud ja selliste kontsentratsioonide juures saadud andmed tuleks jätta arvestamata. Kui uuritav kemikaal segab oluliselt hormoonide määramist rohkem kui ühel kontsentratsioonil, mis ei ole tsütotoksiline, tuleb kasutada muud hormoonide määramise süsteemi. Selleks et vältida saastavate kemikaalide segavat mõju, on soovitatav hormoonid keskkonnast sobiva lahustiga ekstraheerida; võimalikud meetodid on esitatud valideerimisaruandes (4).

Tabel 1

Tulemuste õigsuse kriteeriumid hormoonide mõõtmise süsteemide puhul

Näitaja	Kriteerium
Mõõtmismeetodi tundlikkus	Mõõtmispiir T: 100 pg/ml; E2: 10 pg/ml ^(a)
Hormoonide ekstraheerimise tõhusus (ainult siis, kui on vaja ekstraheerida)	Tembitud hormooniproovide keskmine ekstraheerimismäär (mis põhineb kolmel mõõtmisel) ei tohiks erineda üle 30 % lisatud kogusest.
Kemikaali segav mõju (ainult antikeha-põhised süsteemid)	Olulisi ristreaktsioone ($> 30\%$ vastava hormooni baastasemest) ei ole ühegi raku poolt sünteesitava hormooniga ^(b) ^(c) .

^(a) Märkus: meetodi mõõtmispiirid põhinevad tabelis 5 esitatud hormoonide sünteesi baastaseme väärtustel ja sõltuvad määramise kvaliteedist. Kui saavutatakse kõrgem hormoonide baastase, võib piir olla kõrgem.

^(b) Mõned T ja E2 antikehad võivad suurema protsendimäära korral ristreageerida vastavalt androsteendiooni ja östrooniga. Sellisel juhul ei ole võimalik õigesti määrata mõju 17 β -hüdroksüsteroidehüdrogenaasile. Siiski võib andmetest saada kasulikke teavet mõju kohta üldisele östrogeeni või androgeeni sünteesile. Sellistel juhtudel tuleks andmed väljendada pigem androgeeni/östrogeeni toimena, mitte E2 ja T-na.

^(c) Need hõlmavad järgmisi: kolesterool, pregnenoloon, progesteron, 11-desoksükortikosteron, kortikosteron, aldosteron, 17 α -pregnenoloon, 17 α -progesteron, desoksükortisool, kortisool, DHEA, androsteendioon, östroon.

Labori pädevuse katse

33. Enne tundmatu kemikaali katsetamist peaks labor näitama, et ta suudab saavutada ja säilitada asjakohast rakukultuuri ja katsetingimusi, mis on vajalikud katse edukaks läbiviimiseks; selleks tehakse labori pädevuse katse. Kuna katse tulemuslikkus sõltub otseselt laboris analüüsi tegevatest inimestest, tuleb neid katseid osaliselt korrata, kui labori töötajaskonnas on muutusi.
34. Labori pädevuse katse tehakse samades tingimustes, mis on loetletud punktides 38–40: rakud viiakse kokkupuutesse tugeva, mõõduka ja nõrga aktivaatori ja pärssija 7 kontsentratsiooniga ja negatiivse kemikaaliga (vt tabel 2). Konkreetsetelt kuuluvad uuritavate ainete hulka järgmised kemikaalid: tugev aktivaator forskoliin (CASi nr 66575-29-9); tugev pärssija prokloraas (CASi nr 67747-09-5); mõõdukas aktivaator atrasiin (CASi nr 1912-24-9); mõõdukas pärssija aminoglutetimiid (CASi nr 125-84-8); nõrk (E2 sünteesi)

▼ M5

aktivaator ja nõrk (T sünteesi) pärssija bisfenool A (CASi nr 80-05-7) ning negatiivne kemikaal inimese kooriongonadotropiin (HCG) (CASi nr 9002-61-3), vt tabel 2. Eraldi plaatidel tehakse katsed kõigi kemikaalidega, kasutades tabelis 6 näidatud formaati. Iga päev tuleb koos katsetega teha ka üks katse kvaliteedikontrolli plaadiga (tabel 4, punktid 36-37), millele pannakse labori pädevuse kontrollimise kemikaalid.

Tabel 2

Pädevuse kontrollimise kemikaalid ja kokkupuutekontsentratsioonid

Pädevuse kontrollimise kemikaal	Uuritavad kontsentratsioonid [μM]
prokloraas	0 ^(a) , 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1, 3, 10
forskoliin	0 ^(a) , 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3, 10, 30
atrasiin	0 ^(a) , 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100
aminoglutetimiid	0 ^(a) , 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100
bisfenool A	0 ^(a) , 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100
HCG	0 ^(a) , 0,03; 0,1; 1; 3; 10, 30, 100

^(a) Lahusti (DMSO) kontroll (0), 1 μl DMSO-d süvendisse.

H295R kokkupuude pädevuse kontrollimise kemikaalidega tuleks teha 24 süvendiga plaatidel labori pädevuse kontrollimise katse ajal. Doosi ühik kõigi uuritavate kemikaalide puhul on μM . Doosid tuleks manustada DMSO-lahusena, 0,1 mahuprotsenti igasse süvendisse. Iga uuritavat kontsentratsiooni tuleks katsetada kolmes süvendis (tabel 6). Iga kemikaali uuritakse eraldi plaadil. Iga päev lisatakse plaatide hulka üks kvaliteedikontrolli plaat.

35. Rakkude elujõulisuse ja hormoonide analüüsid tuleb teha vastavalt punktidele 42–46. Teatatakse läviväärtus (vähim avastatava mõjuga kontsentratsioon, *lowest observed effect concentration*, LOEC) ja otsus klassifitseerimise kohta ning tulemusi võrreldakse tabelis 3 esitatud väärtustega. Andmed loetakse kasutamiskõlblikuks, kui need vastavad LOEC-le ja klassifitseerimisotsusele, mis on esitatud tabelis 3.

Tabel 3

Läviväärtused (LOEC) ja klassifitseerimisotsused pädevuse kontrollimise kemikaalide puhul

	CASi number	LOEC [μM]		Klassifitseerimisotsus	
		T	E2	T	E2
prokloraas	67747-09-5	$\leq 0,1$	$\leq 1,0$	+ ^(a) (Pärssimine)	+ (pärsimine)
forskoliin	66575-29-9	≤ 10	$\leq 0,1$	+ (aktiveerimine)	+ (aktiveerimine)
atrasiin	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (aktiveerimine)	+ (aktiveerimine)
aminoglutetimiid	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (pärsimine)	+ (pärsimine)

▼ M5

	CASi number	LOEC [μ M]		Klassifitseerimisotsus	
		T	E2	T	E2
bisfenool A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (pärssimine)	+ (aktiveerimine)
HCG	9002-61-3	Puudub	Puudub	Negatiivne	Negatiivne

(^a) +, positiivne

Puudub: ei kohaldata, kuna pärast kokkupuudet negatiivse kontrolli mittetsütotoksilise kontsentratsiooniga ei tohiks muutusi olla.

Kvaliteedikontrolli plaat

36. Kvaliteedikontrolli plaati kasutatakse H295R-rakkude toimimise tõendamiseks rakkude kasvatamise standardtingimustes ja varasemate katsete andmebaasi loomiseks, millesse pannakse hormoonide kontsentratsioon lahusti kontrolli katsetes, positiivse ja negatiivse kontrolli katsetes, samuti varasemate katsete muud kvaliteedikontrolli peegeldavad näitajad.

— H295R-rakkude toimimist tuleks hinnata nii, et kvaliteedikontrolli plaadiga kontrollitakse iga uut ATCC partiid, samuti varem külmutatud rakkude iga sulatatud partiid, kui sama rakkude partiiga ei tehta labori pädevuse katset (punktid 32–34).

— Üks kvaliteedikontrolli plaat võimaldab täielikult hinnata katse tingimusi (nt rakkude elujõulisus, lahusti kontrollid, negatiivsed ja positiivsed kontrollid, samuti katsetevaheline ja katsesisene varieeruvus) kemikaali katsetamisel ning see peaks kuuluma iga katse juurde.

37. Kvaliteedikontrolli katse tehakse 24 süvendiga plaadil ja selle puhul kasutatakse samasugust inkubeerimise, dooside manustamise, rakkude eluvõimelisuse või tsütotoksilisuse määramise, hormoonide ekstraheerimise ja analüüsimise korda, mida on kirjeldatud punktides 38–46 kemikaalide katsetamiseks. Kvaliteedikontrolli plaadil on tühikatsed, lahusti kontrollid ning E2 ja T teadaoleva aktivaatori kaks kontsentratsiooni (forskoliin, 1 ja 10 μ M) ning teadaoleva pärssija kaks kontsentratsiooni (prokloraas, 0,1 ja 1 μ M). Lisaks kasutatakse MeOH teatavates süvendites kui rakkude eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse positiivset kontrolli. Plaadi üksikasjalik kirjeldus on esitatud tabelis 4. Kriteeriumid, millele peavad vastama kvaliteedikontrolli plaadi tulemused, on loetletud tabelis 5. Nii lahusti kontrolli kui ka tühikatsete süvendites tuleb saavutada T ja E2 sünteesi minimaalne baastase.

Tabel 4

Kvaliteedikontrolli plaat, millega kontrollitakse mõjutamata H295R-rakkude ja teadaolevate pärssijatega (PRO — prokloraas) ja aktiveerijate (FOR — forskoliin) kokkupuutes olevate H295R-rakkude E2 ja T sünteesi. Pärast kokkupuutekatse lõpetamist ja keskkonna kõrvaldamist lisatakse kõikidesse MeOH süvenditesse 70 % metanoolilahust; see on tsütotoksilisuse positiivne kontroll (vt tsütotoksilisuse katse valideerimisaruande (4) III liites)

	1	2	3	4	5	6
A	Tühikatse (^a)	Tühikatse (^a)	Tühikatse (^a)	Tühikatse (^a) (+ MeOH) (^b)	Tühikatse (^a) (+ MeOH) (^b)	Tühikatse (^a) (+ MeOH) (^b)
B	DMSO (^c) 1 μ l	DMSO (^c) 1 μ l	DMSO (^c) 1 μ l	DMSO (^c) 1 μ l (+ MeOH) (^b)	DMSO (^c) 1 μ l (+ MeOH) (^b)	DMSO (^c) 1 μ l (+ MeOH) (^b)

▼M5

	1	2	3	4	5	6
C	FOR 1 µM	FOR 1 µM	FOR 1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM	PRO 0,1 µM
D	FOR 10 µM	FOR 10 µM	FOR 10 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM	PRO 1 µM

(a) Tühikitse süvendites olevatele rakkudele lisatakse ainult keskkonda (st lahustit ei lisata).

(b) Metanool (MeOH) lisatakse pärast seda, kui kokkupuude on lõpetatud ja keskkond on nendest süvenditest eemaldatud.

(c) DMSO lahusti kontrolli katse (1 µl süvendi kohta).

Tabel 5

Kvaliteedikontrolli plaadi tulemuslikkuse kriteeriumid

	T	E2
Hormoonide baassünteesis lahusti kontrollis (SC)	≥ 5 korda LOQ	≥ 2,5 korda LOQ
Aktiveerimine (10 µM forskoliin)	≥ 1,5 korda SC	≥ 7,5 korda SC
Pärssimine (1µM proklo- raas)	≥ 0,5 korda SC	≥ 0,5 korda SC

KEMIKAALIGA KOKKUPUUTESSE VIIMINE

38. Eelinkubeeritud rakud võetakse inkubaatorist välja (punkt 21) ja kontrollitakse mikroskoobi all, et teha kindlaks, kas need on heas seisundis (kleepumine, morfoloogia) enne kemikaaliga kokkupuutesse viimist.
39. Rakud pannakse bioohutuskambrisse ja eemaldatakse täiendatud keskkond ning asendatakse uue täiendatud keskkonnaga (1 ml süvendi kohta). Käesoleva katsemeetodi puhul on eelistatud lahusti DMSO. Kui on olemas põhjusi muude lahustite kasutamiseks, tuleks esitada teaduslik põhjendus. Rakud viiakse uuritava kemikaaliga kokkupuutesse, milleks lisatakse 1 µl sobivat põhilahust dimetüülsulfoksiidis (vt valideerimisaruande (4) II liide) süvendis oleva täiendatud keskkonna 1 ml kohta (süvendi maht). Sellega saavutatakse süvendites DMSO lõppkontsentratsioon 0,1 %. Vajaliku segamise kindlustamiseks eelistatakse üldiselt segada uuritava kemikaali sobiv põhilahus DMSO täiendatud keskkonnaga, et saada iga doosi vajalik lõppkontsentratsioon, ja selline segu lisatakse igasse süvendisse kohe pärast vana keskkonna eemaldamist. Kui kasutatakse sellist varianti, peaks DMSO kontsentratsioon (0,1 %) olema ühesugune kõikides süvendites. Süvendeid, milles on kaks kõige kõrgemat kontsentratsiooni, kontrollitakse visuaalselt stereomikroskoobiga, et neis ei oleks sadet ega hägu, mis osutaks kemikaali ebapiisavale lahustuvusele. Kui leitakse hägusust või sademe tekkimist, kontrollitakse ka järgmise kahe kontsentratsiooniga süvendeid (jne); kontsentratsioon, mille juures ei saavutatud täielikku lahustumist, ei arvestata edasisel hindamisel ja analüüsil. Plaat pannakse tagasi inkubaatorisse 37 °C juurde 5 % CO₂-sisaldusega õhu atmosfääri 48 tunniks. Uuritava kemikaaliga katse plaat on näidatud tabelis 6. Põhilahused 1–7 näitavad uuritava kemikaali suurenevate dooside paigutust.

▼M5

Tabel 6

Dooside manustamise skeem H295R-rakkude kokkupuutel uuritava kemikaaliga 24-süvendilisel plaadil

	1	2	3	4	5	6
A	DMSO	DMSO	DMSO	Põhilahus 4	Põhilahus 4	Põhilahus 4
B	Põhilahus 1	Põhilahus 1	Põhilahus 1	Põhilahus 5	Põhilahus 5	Põhilahus 5
C	Põhilahus 2	Põhilahus 2	Põhilahus 2	Põhilahus 6	Põhilahus 6	Põhilahus 6
D	Põhilahus 3	Põhilahus 3	Põhilahus 3	Põhilahus 7	Põhilahus 7	Põhilahus 7

40. Pärast 48-tunnist kokkupuudet võetakse plaadid inkubaatorist ja iga süvendit kontrollitakse mikroskoobiga rakkude seisundi (kleepumine, morfoloogia, laatumise määr) ja tsütotoksikoloogilise suhte. Iga süvendi keskkond jagatakse kaheks võrdseks osaks (kumbki ligikaudu 490 µl) ja kantakse kahte korralikult märgistatud viaali (st üks alikvoort annab iga süvendi kohta varuproovi). Rakkude kuivamise vältimiseks eemaldatakse keskkond korraga ühe rea süvenditest ja asendatakse keskkonnaga rakkude eluvõimelisuse (tsütotoksilisuse) katseks. Kui rakkude eluvõimelisust (tsütotoksilisust) kohe määrama ei hakata, lisatakse igasse süvendisse 200 µl fosfaatpuhvrit sisaldavat soolalahust, mis sisaldab Ca²⁺ ja Mg²⁺. Keskkond külmutatakse – 80 °C juures kuni edasise töötlemiseni hormoonikontsentratsioonide määramiseks (vt punktid 44–46). T ja E2 on – 80 °C juures hoitavas keskkonnas üldiselt stabiilsed vähemalt kolm kuud, kuid hormoonide stabiilsus säilitamisel tuleks dokumentaalselt tõendada igas laboris.
41. Kohe pärast keskkonna eemaldamist määratakse igal kemikaaliga kokkupuute plaadil rakkude eluvõimelisus/tsütotoksilisus.

Rakkude eluvõimelisuse määramine

42. Rakkude eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse katset võib teha mitmel viisil; katse eesmärk on teha kindlaks kemikaali võimalik mõju rakkude eluvõimele. Katsega peaks saama määrata süvendis olevate eluvõimeliste rakkude tegelikku protsendimäära või tuleb näidata, et see on võrreldav katsega Live/Dead® (on selle lineaarne funktsioon) (vt valideerimisaruande (4) III liide). Samavõrra hästi töötab teine katse MTT-ga ([3-(4,5-dimetüültiliasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasooliumbromiid] (18)). Rakkude eluvõimelisuse hindamine nimetatud meetoditega on suhteline ja selle puhul ei pruugi tingimata olla lineaarset sõltuvust süvendis olevate rakkude absoluutsest arvust. Seepärast tuleks igas süvendis rakke paralleelselt hinnata ka silmaga ning teha lahusti kontrolli ja kahe kõrgeima mittetsütotoksilise kontsentratsiooni katse digitaalpildid arhiivi jaoks, et hiljem oleks võimalik määrata tegelikku rakkude tihedust, kui seda on vaja. Kui visuaalne kontrollimine või eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse katse näitab rakkude arvu suurenemist, tuleb seda näilist kasvu kontrollida. Kui rakkude arvu suurenemist kontrollitakse, tuleks see märkida katseprotokollis. Rakkude eluvõimelisus väljendatakse suhtena lahusti kontrolli katsete keskmise tulemusse; viimast peetakse 100 % eluvõimelisuseks ja see arvutatakse vastavalt kasutatava rakkude eluvõimelisuse/tsütoloogilise katse eeskirjale. MTT-katse puhul võib kasutada järgmist valemit:

▼ **M5**

eluvõimeliste rakkude % = (väärtus süvendis – MeOH-ga [= 100 % surnud] süvendite keskvärtus) ÷ (lahustikontrolli süvendite keskvärtus – MeOH-ga [= 100 % surnud] süvendite keskvärtus)

43. Süvendid, milles eluvõimelisus on alla 80 % võrreldes keskmise eluvõimelisusega lahusti kontrolli katsetes (= 100 % eluvõimelisus), tuleks lõplikust andmete analüüsist välja jätta. Kui steroidogeneesi pärssimine toimub peaaegu 20-protsendilise tsütotoksilisuse juures, tuleb tulemust hoolikalt hinnata ja tõendada, et pärssimise põhjuseks ei ole tsütotoksilisus.

Hormoonide analüüs

44. Iga labor võib kasutada vabalt valitud süsteemi hormoonide T ja E2 mõõtmiseks. Iga doosirühma vabasid keskkonna alikvoote võib kasutada lahjenduste tegemiseks, et viia kontsentratsioon standardkõvera lineaarsesse osasse. Nagu märgitud punktis 29, peaks iga labor tõendama, et tema hormoonide määramise süsteem (nt ELISA, RIA, LC-MS, LC-MS/MS) vastab kvaliteedikontrolli kriteeriumidele. Selle jaoks tuleb enne kvaliteedikontrolli katseid või kemikaalide katsetamist täiendatud keskkonda tempida hormooni sisestandardiga. Selleks et tagada, et katsesüsteemi komponendid ei segaks hormoonide määramist, võib olla vajalik need enne määramist keskkonnast ekstraheerida (vt punkt 30, millistel tingimustel ekstraheerimine on või ei ole vajalik). On soovitatav teha ekstraheerimine nii, nagu on kirjeldatud valideerimisaruande (4) III liites.
45. Kui hormoonide sünteesi mõõdetakse kaubandusliku katsekomplektiga, tuleb hormoonide analüüs teha vastavalt katsekomplekti tootja juhenditele. Enamikul tootjatest on oma individuaalne meetod hormoonide analüüsi tegemiseks. Uuritavaid proove on vaja lahjendada nii, et eeldatavad hormoonide kontsentratsioonid lahusti kontrolli katsetes langevad üksikkatse standardkõveral lineaarse osa keskele (valideerimisaruande (4) III liide). Väärtused väljaspool standardkõvera lineaarset osa tuleb jätta arvestamata.
46. Lõplik hormoonide kontsentratsioon arvutatakse järgmiselt.

Näide:

Ekstraheeriti:	450 µl keskkonda
Lahustati:	250 µl katsepuhvril
Lahjendus analüüsiks:	1: 10 (proovi tulemuse toomiseks standardkõvera lineaarsesse osasse)
Hormooni kontsentratsioon mõõdetud proovis:	150 pg/ml (pärast kohandamist kontsentratsiooniks mõõdetud proovi milliliitris)
Taas leitud:	89 %
Lõplik hormooni kontsentratsioon =	(hormooni kontsentratsioon (milliliitri kohta) ÷ taas leitud) (lahjendustegur)
Lõplik hormooni kontsentratsioon =	(150 pg/ml) ÷ (0,89) × (250 µl/450 µl) × 10 = 936,3 pg/ml

▼ M5

Uuritavate kontsentratsioonide valimine

47. Tuleks teha vähemalt kaks sõltumatut analüüsikatset. Kui katses kasutata-
vate kontsentratsioonide valimiseks ei ole varasemast teavet lahustuvuspää-
rde või tsütotoksilisuse kohta, siis soovitakse esimesel katsel võtta katse-
kontsentratsioonid vahega \log_{10} , kusjuures 10^{-3} M on maksimaalne kont-
sentratsioon. Kui kemikaal on lahustuv ja ei ole tsütotoksiline ühelgi uuritud
kontsentratsioonil ning esimesel katsel andsid kõik kontsentratsioonid nega-
tiivse tulemuse, siis tuleb seda kinnitada veel ühe katsega, kasutades samu
tingimusi kui esimesel katsel (tabel 7). Kui esimese katse tulemused on
ebaselged (st suuruse suhteline muutus (kordades) on lahusti kontrolliga
võrreldes statistiliselt oluline ainult ühel kontsentratsioonil) või positiivsed
(st suuruse suhteline muutus lahusti kontrolliga võrreldes on statistiliselt
oluline kahe või enama kõrvuti oleva kontsentratsiooni puhul), tuleb katset
korrata, nagu on näidatud tabelis 7, täpsustades katseks kontsentratsioonide
valimist. Uuritavaid kontsentratsioone teises ja kolmandas katses (kui see
tehtakse) tuleks kohandada, arvestades esimeses katses mõju põhjustanud
kontsentratsioonivahemikku, kasutades poole logaritmilise ühiku suurusi
kontsentratsioonivahemikke (nt kui esimeses katses kontsentratsioonidega
0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100, 1000 μM leiti aktivatsioon kontsentratsioonidel
1 ja 10 μM , tuleks teises katses valida kontsentratsioonideks 0,1, 0,3, 1, 3,
10, 30, 100 μM), kui ei ole vaja kasutada väiksemaid kontsentratsioone
LOEC saavutamiseks. Viimasel juhul kasutatakse vähemalt viit kontsentrat-
siooni allpool madalaimat esimeses katses uuritud kontsentratsiooni poole
logaritmilise ühiku suuruse vahega. Kui teine katse ei kinnita esimest katset
(st statistiliselt olulist erinevust ei leita varem positiivse kontsentratsiooni
ümbruses ± 1 kontsentratsiooniinkrement), tuleb teha kolmas katse, kasu-
tades esialgseid katsetingimusi. Esimese katse ebaselged tulemused loetakse
negatiivseks, kui täheldatud mõju ei õnnestu kinnitada ühegi järgmises
kahest katsest. Ebaselged tulemused loetakse positiivseks toimeks, kui
reaktsiooni õnnestub kinnitada vähemalt ühes järgmises katses kontsentrat-
sioonil ± 1 kontsentratsiooniinkrement (vt punkt 55, andmete tõlgendamise
meetod).

Tabel 7

Otsuste maatriks võimalike tulemusestsenariumide korral

1. katse	2. katse		3. katse		Otsus	
	Stsenaarium	Otsus	Stsenaarium	Otsus	Positiivne	Negatiivne
Negatiivne	Kinnita ^(a)	Negatiivne	Stopp			X
Negatiivne	Kinnita ^(a)	Positiivne	Täpsusta ^(b)	Nega- tiivne		X
Ebaselge ^(c)	Täpsusta ^(b)	Negatiivne	Kinnita ^(a)	Nega- tiivne		X
Ebaselge ^(c)	Täpsusta ^(b)	Negatiivne	Kinnita ^(a)	Posi- tiivne	X	
Ebaselge ^(c)	Täpsusta ^(b)	Positiivne			X	
Positiivne	Täpsusta ^(b)	Negatiivne	Kinnita ^(a)	Posi- tiivne	X	

▼ M5

1. katse	2. katse		3. katse		Otsus	
Stsenaarium	Otsus	Stsenaarium	Otsus	Stsenaarium	Positiivne	Negatiivne
Negatiivne	Kinnita ^(a)	Positiivne	Täpsusta ^(b)	Positiivne	X	
Positiivne	Täpsusta ^(b)	Positiivne	Stopp		X	

^(a) Kinnita eelmist katset, kasutades sama eksperimendiplaani.

^(b) Korda katset poole logaritmilise ühiku suuruste kontsentratsioonivahemikega (mõlemale poole kontsentratsioonist, mis eelmises katses osutus oluliselt erinevaks).

^(c) Suuruse suhteline muutus (kordades) on lahusti kontrolliga võrreldes statistiliselt oluline ühel kontsentratsioonil.

Katseplaadi kvaliteedikontroll

48. Lisaks kvaliteedikontrolli plaadi kriteeriumide täitmisele tuleks täita ka muid kvaliteedikriteeriume, mis on seotud paralleelsüvendite tulemuste lubatavate erinevustega, korduskatsetega, hormooni määramise süsteemide lineaarsuse ja tundlikkusega, ühest ja samast proovist hormooni paralleelsete määramiste erinevustega ja tembitud hormoonipiikide taasleidmise protsendimääraga pärast keskkonna ekstraheerimist (kui seda tehakse; vt nõuded ekstraheerimisele, punkt 30); sellised kvaliteedikriteeriumid on esitatud tabelis 8. Andmed peaksid langema iga näitaja lubatavasse väärtuste vahemikku, ainult siis saab neid arvestada edasisel hindamisel. Kui need kriteeriumid ei ole täidetud, tuleks tabelis märkida, et kvaliteedikontrolli kriteeriumid ei olnud kõnealusel proovis täidetud; proov tuleks uuesti analüüsida või andmed välja visata.

Tabel 8

H295R-katse plaadi näitajate lubatavad väärtused ja varieerumisvahemik (%)

(LOQ — hormooni määramise süsteemi mõõtmispiir (*Limit of Quantification*); CV — variatsioonikordaja; SC — lahusti kontrollkatse; DPM — lagunemist minutis)

	Võrreldavad suurused	T	E2
Hormoonide baassüntees lahusti kontrolli katsetes	Suhteline suurenemine võrreldes LOQga	≥ 5 korda	≥ 2,5 korda
Kokkupuutekatsetes — plaa-disisene CV lahusti kontrolli katsetes (paralleelsüvendid)	Absoluutsed kontsentratsioonid	≤ 30 %	≤ 30 %
Kokkupuutekatsetes — plaa-tidevaheline CV lahusti kontrolli katsetes (paralleelkatsetes)	Muutus kordades	≤ 30 %	≤ 30 %
Hormoonide mõõtmise süsteem — tundlikkus	Tuvastatav suhteline vähenemine, võrreldes lahusti kontrolliga	≥ 5 korda	≥ 2,5 korda
Hormoonide mõõtmise süsteem — kordusmõõtmised lahusti kontrollide CV ^(a)	Absoluutsed kontsentratsioonid	≤ 25 %	≤ 25 %
Keskkonna ekstraheerimine — 3H-sisestandardi taasleidmine (vajaduse korral)	DPM	≥ 65 % nominaalsest	

^(a) Tähebtab ühe ja sama proovi kordusmõõtmisi.

▼ **M5****KATSEANDMETE ANALÜÜS JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE****Andmete analüüs**

49. Selleks, et hinnata hormoonide sünteesi suhtelist suurenemist või vähenemist kemikaali juuresolekul, tuleb tulemused normeerida lahusti kontrolli tulemuste keskväertusega igal plaadil, ja tulemused esitatakse suhteliste muutustena, võrreldes lahusti kontrolliga igal katseplaadil. Kõik andmed esitatakse kujul keskväertus ± 1 standardhälve (SD).

50. Andmete analüüsil arvestatakse ainult süvendeid, milles tsütotoksilisus oli alla 20 %. Suhtelised muutused tuleks arvutada järgmiselt:

suhteline muutus = (hormooni kontsentratsioon igas süvendis) \div (kõikide lahusti kontrollide hormooni kontsentratsiooni keskväertus).

51. Kui süvendi visuaalse kontrollimise või punktis 42 kirjeldatud eluvõimelisuse/tsütotoksilisuse katsega näidati rakkude arvu suurenemist, tuleb seda näilist suurenemist kontrollida. Kui rakkude arvu suurenemist kontrollitakse, tuleks see märkida katseprotokollis.

52. Enne statistilise analüüsi tegemist tuleks hinnata normaaljaotuse ja dispersiooni homogeensuse eelduste kehtivust. Normaaljaotust tuleks hinnata standardsete tõenäosusgraafikute või muu sobiva statistilise meetodiga (nt Shapiro-Wilki katse). Kui andmed (suhtelised muutused kordades) ei ole normaaljaotusega, tuleks püüda andmeid teisendada, et lähendada neid normaaljaotusele. Kui andmed on normaaljaotusega või ligikaudu normaaljaotusega, tuleks analüüsida erinevusi kemikaali kontsentratsioonirühmade ja lahusti kontrollide vahel, kasutades parameetrilist testi (nt Dunnetti testi), milles *kontsentratsioon* on sõltumatu muutuja, ja *toime* (suhteline muutus kordades) on sõltuv muutuja. Kui andmed ei ole normaaljaotusega, tuleb kasutada sobivat mitteparameetrilist testi (nt Kruskal Wallis, Steeli mitmese võrdluse astaktest). Erinevused loetakse oluliseks $p \leq 0,05$ puhul. Statistiline hindamine tehakse iga süvendi keskväertuste alusel, mis esindavad sõltumatuid paralleelidega andmepunkte. Eeldatakse, et kuna esimeses katses on dooside vahel suured vahed (\log_{10} skaala), ei ole paljudel juhtudel võimalik täpselt kirjeldada kontsentratsiooni-toime sõltuvust, kui kaks kõrgeimat kontsentratsiooni on sigmoidse kõvera lineaarses osas. Seepärast kasutatakse esimese katse või muude andmete puhul, kus see olukord esineb (nt kui ei hinnata maksimaalset tõhusust), I tüüpi fikseeritud muutuja statistikat, nagu on kirjeldatud eespool.

53. Kui rohkem kui kaks andmepunkti asuvad kõvera lineaarsel osal ja on võimalik arvutada maksimaalseid tõhususi — nagu eeldatakse mõne teise katse juures, mille tegemisel kasutatakse poole logaritmilise ühiku suurusi kokkupuutekontsentratsioonide erinevusi — tuleks kasutada probit-, logit- või muud sobivat regressioonimudelit, et arvutada tõhususega seotud kontsentratsioone (nt EC50 ja EC20).

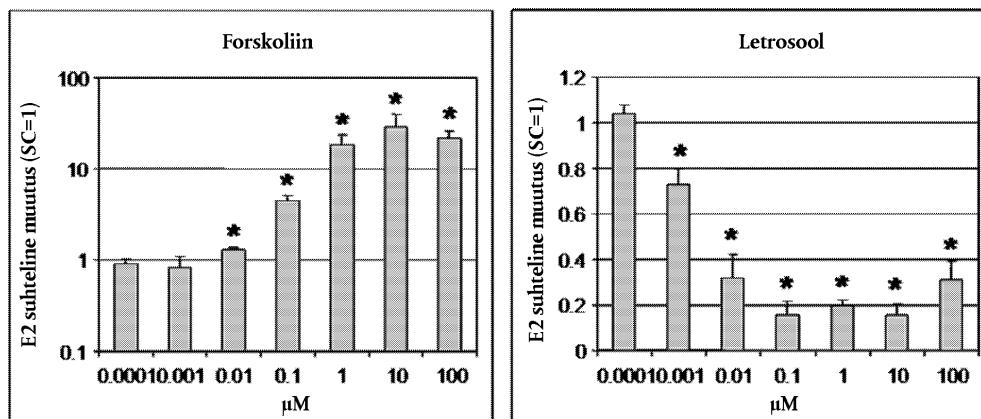
54. Tulemused tuleks esitada nii graafiliselt (tulppiagrammid, mis näitavad keskväertust ± 1 SD) kui ka tabelina (LOEC/NOEC, mõju suund, ja maksimaalse toime tugevus, mis on osa andmete doosi-toime aspektist) (vt näide joonisel 3). Andmete hindamine on ainult siis kehtiv, kui see põhineb vähemalt kahel sõltumatul katsel. Katset loetakse sõltumatuks, kui see on läbi viidud muul kuupäeval, uute lahuste ja kontrollidega. Teises ja (vajaduse korral) kolmandas katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku võib valida esimese katse tulemuste põhjal, et paremini määratleda doosi-toime vahemik, milles asub LOEC (vt punkt 47).

▼ M5

Joonis 3

H295R-katsega saadud andmete graafikuna ja tabelina esitamise ja hindamise näide

(tärm märgib statistiliselt olulisi erinevusi solvendi kontrollist ($p < 0,05$); LOEC — vähim täheldatavat toimet avaldav kontsentratsioon (*lowest observed effective concentration*); suurim muutus — toime maksimaalne tugevus igal kontsentratsioonil võrreldes lahusti kontrolli keskväertusega (= 1))



Kemikaal	LOEC	Suurim muutus
forskoliin	0,01	0,15 korda
letrosool	0,001	29 korda

Andmete tõlgendamise kord

55. Uuritav kemikaal tunnistatakse positiivseks, kui suhteline aktivatsioon (kordades) on statistiliselt erinev ($p \leq 0,05$) lahusti kontrollist kahel kõrvuti oleval kontsentratsioonil vähemalt kahes sõltumatus katses (tabel 7). Uuritav kemikaal tunnistatakse negatiivseks pärast kahte sõltumatut negatiivset katset või pärast kolme katset, millest kaks olid negatiivsed ja üks ebaselge või positiivne. Kui andmed, mis on saadud kolme iseseisva katsega, ei vasta tabelis 7 loetletud otsustamise kriteeriumidele, ei ole uurimistulemused tõlgendatavad. Tulemusi, mis on saadud lahustuvuspiirist kõrgema või tsütotoksilise kontsentratsiooni juures, ei tohiks kasutada tulemuste tõlgendamiseks.

Katseprotokoll

56. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uurimislabor:

- nimi ja asukoht;
- uuringu juht, muud töötajad ja nende kohustused uuringu käigus;
- uuringu alguse ja lõpetamise kuupäevad.

▼ **M5***Uuritav kemikaal, reaktiivid ja kontrollid:*

- identifitseerimisandmed (nimetus ja CASi number, kui on olemas), päritolu, partii number, puhtus, tarnija, ning uuritava kemikaali, reaktiivide ja kontrollide iseloomustus;
- uuritava kemikaali füüsiline olek ja asjaomased füüsikalise-keemilised omadused;
- uuritavate kemikaalide, reaktiivide ja kontrollide säilitustingimused ning katseks ettevalmistamise meetod ja sagedus;
- uuritava kemikaali stabiilsus.

Rakud:

- allikas ja rakutüüp;
- katses kasutatud rakkude passaažide arv (rakupassaaži tunnus);
 - rakukultuuride säilitusmeetodite korra kirjeldus.

Enne katset täidetavad nõuded (vajaduse korral):

- uuritava kemikaali võimalik segav mõju hormoonide määramise süsteemile — kontrollkatse kirjeldus ja tulemused;
- hormoonide ekstraheerimise tõhususe mõõtmised — kirjeldus ja tulemused;
- kõigi tehtavate analüüside standard- ja kaliibrimiskõverad;
- valitud analüüsimeetodite avastamispiir.

Katsetingimused:

- keskkonna koostis;
- uuritava kemikaali kontsentratsioon;
- rakkude tihedus (hinnatud või mõõdetud rakkude kontsentratsioon 24 ja 48 tunni järel);
- uuritava kemikaali lahustuvus (lahustumispiir, kui see on määratud);
- inkubatsiooniaeg ja tingimused.

Katsetulemused:

- iga kontrollisüvendi ja kemikaaliga süvendi töötlemata andmed — iga üksiku mõõtmise tulemus otse sellisel kujul, mille annab hormoonide mõõtmiseks kasutatav vahend (nt optilise tiheduse ühikutes, fluorestsentsi ühikutes, lagunemiste arv minutis jne);
- normaaljaotuse eelduse kontrollimine või andmete teisendamise selgitus;
- keskmine toime ± 1 standardhälve igas mõõdetud süvendis;
- tsütotoksilisuse andmed (uuritavad kontsentratsioonid, mis olid tsütotoksilised);
- kinnitus selle kohta, et kvaliteedikontrolli nõuded olid täidetud;

▼ **M5**

- suhteline muutus võrreldes lahusti kontrolli proovidega, tsütotoksilisuse parandiga;
- tulpdiaagramm, mis näitab suhtelist muutust (kordades) igal kontsentratsioonil, koos standardhälbe ja statistilise olulisusega, vt punktid 49–54.

Andmete tõlgendamine:

- andmete tõlgendamise korra kohaldamine tulemustele ja tähelepanekute arutelu.

Arutelu:

- kas tulemustest järeldub midagi võimaluse kohta, et T ja E2 andmeid võisid mõjutada kaudsed mõjud glüko- ja mineraalkortikoidide radadele?

*Järeldused***KIRJANDUS**

- 1) OECD (2002), Sisesekretoonisüsteemi kahjustavate kemikaalide kontrollimise ja hindamise OECD kontseptuaalne raamistik, käesoleva lisa peatüki B.54 2. liide.
- 2) Hecker, M., Newsted, J.L., Murphy, M.B., Higley, E.B., Jones, P.D., Wu, R. and Giesy, J.P. (2006), Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: Hormone production, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 217, 114–124.
- 3) Hecker, M., Hollert, H., Cooper, R., Vinggaard, A.-M., Akahori, Y., Murphy, M., Nellemann, C., Higley, E., Newsted, J., Wu, R., Lam, P., Laskey, J., Buckalew, A., Grund, S., Nakai, M., Timm, G., and Giesy, J. P. (2007), The OECD validation program of the H295R steroidogenesis assay for the identification of in vitro inhibitors or inducers of testosterone and estradiol production, Phase 2: inter laboratory pre-validation studies. *Env. Sci. Pollut. Res.*, 14, 23 — 30.
- 4) OECD (2010), *Multi-Laboratory Validation of the H295R Steroidogenesis Assay to Identify Modulators of Testosterone and Estradiol Production*, OECD Series of Testing and Assessment No. 132, ENV/JM/MONO(2010)31, Paris. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html
- 5) OECD (2010), *Peer Review Report of the H295R Cell-Based Assay for Steroidogenesis*, OECD Series of Testing and Assessment No. 133, ENV/JM/MONO(2010)32, Paris. Kättesaadav aadressil http://www.oecd.org/document/30/0,3746,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html
- 6) Battelle (2005), Detailed Review Paper on Steroidogenesis. Kättesaadav aadressil http://www.epa.gov/endo/pubs/edmvs/steroidogenesis_drpfinal_3_29_05.pdf
- 7) Hilscherova, K., Jones, P. D., Gracia, T., Newsted, J. L., Zhang, X., Sanderson, J. T., Yu, R. M. K., Wu, R. S. S. and Giesy, J. P. (2004), Assessment of the Effects of Chemicals on the Expression of Ten Steroidogenic Genes in the H295R Cell Line Using Real-Time PCR, *Toxicol. Sci.*, 81, 78–89.
- 8) Sanderson, J. T., Boerma, J., Lansbergen, G. and Van den Berg, M. (2002), Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 182, 44–54.
- 9) Breen, M.S., Breen, M., Terasaki, N., Yamazaki, M. and Conolly, R.B. (2010), Computational model of steroidogenesis in human H295R cells to predict biochemical response to endocrine-active chemicals: Model development for metyrapone, *Environ. Health Perspect.*, 118: 265–272.

▼ **M5**

- 10) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Assessment of chemical effects on aromatase activity using the H295R cell line, *Environ. Sci. Poll. Res.*, 17:1137–1148.
- 11) Gazdar, A. F., Oie, H. K., Shackleton, C. H., Chen, T. R., Triche, T. J., Myers, C. E., Chrousos, G. P., Brennan, M. F., Stein, C. A. and La Rocca, R. V. (1990), Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses Multiple pathways of steroid biosynthesis, *Cancer Res.*, 50, 5488–5496.
- 12) He, Y.H., Wiseman, S.B., Zhang, X.W., Hecker, M., Jones, P.D., El-Din, M.G., Martin, J.W. and Giesy, J.P. (2010), Ozonation attenuates the steroidogenic disruptive effects of sediment free oil sands process water in the H295R cell line, *Chemosphere*, 80:578–584.
- 13) Zhang, X.W., Yu, R.M.K., Jones, P.D., Lam, G.K.W., Newsted, J.L., Gracia, T., Hecker, M., Hilscherova, K., Sanderson, J.T., Wu, R.S.S. and Giesy, J.P. (2005), Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line, *Environ. Sci. Technol.*, 39:2777-2785.
- 14) Higley, E.B., Newsted, J.L., Zhang, X., Giesy, J.P. and Hecker, M. (2010), Differential assessment of chemical effects on aromatase activity, and E2 and T production using the H295R cell line, *Environ. Sci. Pol. Res.*, 17:1137-1148.
- 15) Rainey, W. E., Bird, I. M., Sawetawan, C., Hanley, N. A., Mccarthy, J. L., Mcgee, E. A., Wester, R. and Mason, J. I. (1993), Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCI-H295) production of C19 steroids, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 77, 731–737.
- 16) Käesoleva lisa peatükk B.55. Hershbergeri biokatse rottidel: kiire sõelkatse (anti)androgeensete omaduste väljaselgitamiseks
- 17) Shapiro, R., and Page, L.B. (1976), Interference by 2,3-dimercapto-1-propanol (BAL) in angiotensin I radioimmunoassay, *J. Lab. Clin. Med.*, 2, 222–231.
- 18) Mosmann, T. (1983), Rapid colorimetric assay for growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.*, 65, 55–63.
- 19) Brock, B.J., Waterman, M.R. (1999). Biochemical differences between rat and human cytochrome P450c17 support the different steroidogenic needs of these two species, *Biochemistry*. 38:1598-1606.
- 20) Oskarsson, A., Ulleras, E., Plant, K., Hinson, J. Goldfarb, P.S., (2006), Steroidogenic gene expression in H295R cells and the human adrenal gland: adrenotoxic effects of lindane in vitro, *J. Appl. Toxicol.*, 26:484–492.

▼ **M5***Liide***MÕISTED**

CV (Coefficient of Variation) – variatsioonikordaja, määratletud kui jaotuse standardhälbe ja aritmeetilise keskmise suhtarv.

CYP – tsütokroom P450 monoooksügenaasid, geenide ja nende järgi sünteesitud ensüümide perekond, mis osaleb väga paljude biokeemiliste reaktsioonide katalüüsimises, sealhulgas steroidhormoonide sünteesi ja metabolismi katalüüsimises.

DPM (disintegrations per minute) – lagunemiste arv minutis. See on teatava koguse radioaktiivse aine ühe minuti jooksul lagunenu aatomite arv.

E2 – 17β-östradiool, kõige tähtsam östrogeen imetajate hormoonisüsteemides.

H295R-rakud – inimese adrenokartsinoomi rakud, millel on tsonaalselt diferentseerumata inimloote neerupealise rakkude füsioloogilised omadused ning milles on ekspresseeritud kõik steroidogeneesi raja ensüümid. Selliseid rakke saab tellida ATCC-st.

Katse – sõltumatu eksperiment, mis tehakse uute lahuste ja uute kontrollidega.

Katseplaat – plaat, millel H295R-rakud viiakse kokkupuutesse uuritavate kemikaalidega. Katseplaadil on lahusti kontroll ja uuritav kemikaal seitsmes kontsentratsioonis, igaüks kolme paralleelina.

Kvaliteedikontroll (QC) – osutab meetmetele, mida on vaja võtta kasutamiskõlblike andmete saamiseks.

Kvaliteedikontrolli plaat – 24 süvendiga plaat, millel on positiivse ja negatiivse kontrolli kaks kontsentratsiooni, millega kontrollitakse uue rakkude partii toimimist või tehakse katse positiivsed kontrollid kemikaalide katsetamisel.

Kemikaal – aine või segu.

Külmutuskeskkond – keskkond, mida kasutatakse rakkude külmutamiseks ja milles hoitakse külmutatud rakke. Selle koostis on järgmine: varulahusekeskkond pluss BD NuSerum ja dimetüülsulfoksiid.

Laatumismäär – iseloomustab pinna katmise või paljunemise määra, mida rakkudele võimaldatakse kasvukeskkonna pinnal või sees.

Lineaarne osa – hormoonide määramise süsteemi standardkõvera osa, milles tulemus on võrdeline proovis oleva analüüdi kontsentratsiooniga.

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) – vähim avastatava mõjuga kontsentratsioon, mille juures katse tulemus on statistiliselt erinev lahusti kontrolli tulemusest.

LOQ (Limit of Quantification) – mõõtmispiir, väikseim kogus kemikaali, mida saab eristada kõnealuse kemikaali puudumisest (tühikatse) teatava usalduspiiri juures. Käesoleva meetodi puhul on LOQ tavaliselt katsesüsteemi valmistaja poolt ette antud, kui seda ei ole täpsustatud teisiti.

NOEC (No Observed Effect Concentration) – kõrgeim uuritud kontsentratsioon, mille juures analüüs ei näita positiivset tulemust.

Passaaž – kordade arv, millal rakud on pärast külmutatud tüvikultuurist kultuuri loomist aluselt eraldatud. Lähtepassaažile, mis tehakse külmutatud tüvikultuurist, omistatakse number üks (1). Rakud, mis on aluselt eraldatud üks kord, nimetatakse passaažiks 2 jne.

▼ M5

PBS – Dulbecco fosfaatpuhvriisandiga keedusoolalahus.

Steroidogenees – sünteesirada, mille kaudu kolesteroolist sünteesitakse mitmesugused steroidhormoonid. Steroidide sünteesi raja mitu vahesaadust nagu progesteron ja testosteroon on ise olulised hormoonid; samas on nad sünteesiraja edasiste hormoonide eellased.

T – testosteroon, üks kahest kõige olulisemast androgeenist imetajate hormoonisüsteemides.

Trüpsiin 1X – lahjendatud trüpsiini (üks ensüüme, kõhunäärme seriinproteas) lahus, mida kasutatakse rakkude eraldamiseks rakkude kasvatamise plaadilt, vt valideerimisaruande (4) III liide.

Täiendatud keskkond – varukeskkond pluss BD Nu-Serum ja ITS+ premium mix, vt valideerimisaruande (4) II liide.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Varukeskkond – lähtekeskkond, mis on alus muude reagendilahuste valmistamiseks. See koosneb Dulbecco modifitseeritud Eagle'i keskkonna ja Hami F-12 toitainesegust (DMEM/F12) vahekorras 1: 1 15 mM HEPES-puhvril, mis ei sisalda fenoolpunast ega Na-vesinikkarbonaati. Na-vesinikkarbonaat lisatakse puhverdamiseks, vt valideerimisaruande (4) II liide.

▼ **M5****B.58. TRANSGEENSE NÄRILISE SOMAATILISTE JA SUGURAKKUDE GEENIDE MUTATSIOONI KATSE**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 488 (2013). ELil on katsemeetodid paljude *in vitro* geenmutatsioonide uuringute tegemiseks, millega on võimalik avastada kromosoomide ja/või geenide mutatsioone. On olemas katsemeetodid *in vivo* näitajate (st kromosoomihälvete ja plaanivälise DNA sünteesi) määramiseks; kuid nendega ei saa mõõta geenimutatsioone. Transgeense närilise (*transgenic rodent*, TGR) mutatsiooni katse rahuldab vajaduse praktilise ja kergesti kättesaadava *in vivo* katse järele, millega saab määrata geenimutatsioone.
2. TGR-mutatsioonikatse kohta on avaldatud põhjalikke ülevaateid (24, 33). Nendes kasutatakse transgeenseid rotte ja hiiri, kelle kromosoomidesse on integreeritud rohkesti plasmidi või faagi-ülekandektorite koopiaid (transgeene). Transgeenid sisaldavad reportergeene mitmesugust tüüpi mutatsioonide avastamiseks, mida *in vivo* tekitavad uuritavad kemikaalid.
3. Närilises tekkivaid mutatsioone loendatakse transgeeni väljavõtmise ja reportergeeni fenotüübi analüüsimisega bakteriaalses peremees-organismis, kellel vastavat reportergeeni ei ole. TGR geenimutatsiooni katsetega mõõdetakse mutatsioone, mis on tekkinud geneetiliselt neutraalsetes geenides, mis eraldatakse praktiliselt kõikidest närilise kudedest. Nende katsetega võib seepärast üle saada paljudest olemasolevatest piirangutest, mis on seotud *in vivo* geenimutatsioonide uurimisega endogeensetes geenides (näiteks piiratud hulk analüüsikõlblikke kudesid, negatiivne või positiivne seleksioon mutatsioonide vastu).
4. Olemasolevad tõendid näitavad veenvalt, et transgeenid reageerivad mutagenidele samal viisil kui endogeensed geenid, eriti mis puutub alusepaari asendustesse, raaminihkemutatsioonidesse ning väikestes deletsioonidesse ja insertioonidesse (24).
5. Genotoksilisuse testimise rahvusvahelistel seminaridel (IWGT) on toetatud TGR-geenimutatsioonikatse kasutamist geenimutatsioonide avastamiseks *in vivo* ja on esitatud soovituslik katse-eeskiri selliste katsete tegemiseks (15, 29). Käesolev katsemeetod põhineb kõnealustel soovitustel. Käesoleva katse-eeskirja kasutamist toetav täiendav analüüs on esitatud viites (16).
6. Arvatavasti on tulevikus võimalik ühendada TGR-geenimutatsiooni katse korduvdoosi toksilisuse uuringuga (käesoleva lisa peatükk B.7). Siiski on vaja veel andmeid selle tõendamiseks, et korduvdoosi toksikoloogia uuringus kasutatav lühem ühepäevane vahe dooside manustamise lõpu ja proovide võtmise vahel ei mõjuta TGR-geenimutatsiooni katseid, mille puhul kasutatakse 3päevast ajavahemikku. On vaja ka andmeid, mis näitaksid, et transgeense näriliselini kasutamine tavaliste näriliseliniide asemel ei kahjusta korduvdoosi katse tulemusi. Kui need andmed saadakse, tuleb käesolevat katsemeetodit ajakohastada.
7. Peamiste terminite tähendused on esitatud liites.

▼ M5

LÄHTEKAALUTLUSED

8. TGR-geenimutatsiooni mudelüsteemid, mille kohta on kogutud piisavalt andmeid, et toetada nende kasutamist käesolevas katsemeetodis, on järgmised: *lacZ*-bakteriofaag-hiir (MutaTMMouse); *lacZ*-plasmiid-hiir; *gpt*-delta- (*gpt*- ja *Spi*⁻)-hiir ja -rott; *lacI*-hiir ja -rott (Big Blue®), kui katse tehakse standardtingimustes. Lisaks võib kasutada *cII*- positiivsevaliku katset, et hinnata mutatsioone Big Blue®- ja MutaTMMouse'i mudelites. Mutageneesi hinnatakse TGR-mudelite puhul tavaliselt mutantide sageduse järgi; vajaduse korral võib kasutada aga ka mutatsioonide molekulaaranalüüsi täiendava teabe saamiseks (vt punkt 24).

9. Need näriliste *in vivo* geenimutatsiooni katsed on eriti olulised mutageensuse ohu hindamisel, kuna katsete tulemused sõltuvad *in vivo* metabolismist, farmakokineetikast, DNA parandusprotsessidest ja DNA sünteesimehhanismi võimest kahjustusega toime tulla, kuigi need omadused võivad eri liikidel ja kudedel olla erinevad ja sõltuda ka DNA kahjustuse tüübist. *In vivo* meetod geenimutatsiooni täiendavaks uurimiseks on kasulik edasiseks uurimiseks, kui *in vitro* süsteemis on leitud mutageenne toime, samuti täiendavate *in vivo* näitajate väljaselgitamiseks (24). Lisaks sellele, et geenimutatsioonid on põhjuslikult seotud vähi tekkimisega, on need ka asjakohane näitaja muude mutatsioonipõhiste haiguste kui vähk (12, 13) ja pärilike haiguste tekkimise ennustamiseks.

10. Kui on tõendeid, et uuritav kemikaal või asjakohane metaboliit ei pääse mõne huvipakkuva koeni, siis ei ole transgeense närilise geenimutatsiooni katse asjakohane.

KATSE PÕHIMÕTE

11. Punktis 8 kirjeldatud katsetes on sihtgeeniks bakteriaalse või bakteriofaagse päritoluga geen ning selle transgeeni närilise genoomsest DNAST väljaeraldamise vahendiks on transgeeni viimine λ -bakteriofaagisse või plasmiid-sesse süstikvektoris. Selleks ekstraheeritakse huvipakkuvast närilisekoest genoomne DNA, töödeldakse seda *in vitro* (süstikvektori taastamiseks pakendatakse λ -vektorid või ligeeritakse ja elektroporeeritakse plasmiidid) ja seejärel tehakse pärast peremeesorganismi (bakterisse) viimist sobivates tingimustes kindlaks mutatsioonid. Analüüsiks kasutatakse neutraalseid transgeene, mida saab enamikust kudedest hõlpsasti jälle välja võtta.

12. Tavaline TGR geenimutatsiooni katse hõlmab näriliste viimist teatavaks ajaks kokkupuutes uuritava kemikaaliga. Kemikaale võib manustada mis tahes asjakohasel viisil, sealhulgas implantatsiooniga (nt meditsiiniseadme testimine). Kogu ajavahemikku, mille jooksul loomale manustatakse kemikaali, nimetatakse manustamisajaks. Manustamisele järgneb tavaliselt teatav aeg enne surmamist, mille jooksul kemikaali ei manustata ja mille jooksul parandamata DNA-kahjustused fikseeruvad püsivateks stabiilseteks mutatsioonideks. Kirjanduses on seda ajavahemikku nimetatud mitmel viisil: avaldumisaeg, kinnistumisaeg või väljendumisaeg (*manifestation*, *fixation*, *expression*); see ajavahemik lõpeb proovivõtuajaga (15, 29). Kui loom on surmatud, eraldatakse huvipakkuvatest kudedest DNA ja puhastatakse.

▼ M5

13. Paljudest pakendamistest või ligeerimistest iga looma ühe koe kohta saadud andmed tavaliselt koondatakse ja muteerumise sagedus hinnatakse tavaliselt kokku 10^5 – 10^7 lüüsilaike või kolooniaid moodustava ühiku põhjal. Kui kasutatakse positiivseid selektsioonimeetodeid, määratakse lüüsilaike moodustavad ühikud eraldi mitteselektiivsete plaatidega.
14. Positiivsed selektsioonimeetodid on välja töötatud mutatsioonide avastamiseks nii *gpt*-geenis [*gpt*-delta-hiir ja -rott, *gpt*-fenotüüp (20, 22, 28)] kui ka *lacZ*-geenis [MutaTMMouse või *lacZ*-plasmiid-hiir (3, 10, 11, 30)]; samas *lacI*-geeni mutatsioon Big Blue®-loomades tuvastatakse mitteselektiivse meetodiga, milles mutante avastatakse värvunud (siniste) lüüsilaike tekkimise järgi. Positiivne selektsioonimeetod on loodud ka punktmutatsioonide avastamiseks λ -bakteriofaagsüstikvektori *cII*-geenis [Big Blue®-hiir või -rott ja MutaTMMouse (17)] ning deletsioonimutatsioonide leidmiseks λ *red* ja *gam* geenides [Spi⁻-selektsioon *gpt*-delta-hiire ja -roti puhul (21, 22, 28)]. Mutatsioonisagedus arvutatakse transgeenis lüüsilaike/plasmiide sisaldavate mutatsioonide arvu jagamisel lüüsilaike/plasmiidide üldarvuga, mis on saadud samast DNA-proovist. Transgeense närilise geenimutatsiooni uurin-gute puhul esitatav näitaja on mutatsioonide sagedus. Lisaks sellele saab mutatsioonisageduse määrata sõltumatut mutatsiooni sisaldavate rakkude määrana; selle arvutuse jaoks on vaja eraldatud mutantide sekveneerimisega teha kloni kasvu arvestav parand(24).
15. Mutatsioonid, mis loendatakse *lacI*, *lacZ*, *cII* ja *gpt* punktmutatsioonide katsetes, kujutavad endast peamiselt alusepaari asenduse, raaminihke ning väikeste insertioonide ja deletsioonidega seotud mutatsioone. Selliste mutatsioonitüüpide suhteline osa spontaansete mutatsioonide hulgas sarnaneb selle piirkonna endogeenses HPRT-geenis tekkivate mutatsioonide suhtelise osaga. Suuri deletsioone avastatakse ainult Spi⁻-selektsioonija *lacZ*-plasmidi katsetega (24). Huvipakkuvad mutatsioonid on *in vivo* mutatsioonid, mis tekivad hiirtel või rottidel. *In vitro* ja *ex vivo* mutatsioonid, mis võivad tekkida faagi/plasmidi tagasisaamisel, replikatsioonil või parandamisel, on võrdlemisi haruldased ja mõnes süsteemis on neid võimalik spetsiifiliselt tuvastada või välistada bakteriaalse peremeesorganismi/positiivse selektsiooni süsteemiga.

MEETODI KIRJELDUS

Ettevalmistused*Loomaliigi valimine*

16. Praegu on olemas mitmesuguseid transgeensete hiirte geenimutatsioonide tuvastamise mudeleid ja neid süsteeme kasutatakse laialdasemalt kui transgeense roti mudeleid. Kui rott on selgelt sobivam mudel kui hiir (nt kui uuritakse üksnes rottidel esineva kasvaja tekkimise mehhanismi, et korreleerida seda rottide puhul avalduva toksilisuse uuringuga, või kui metabolism rotis on teadaolevalt lähedasem metabolismile inimese organismis), siis tuleks kaaluda transgeense roti mudeli kasutamist.

Pidamis- ja söötmingimused

17. Temperatuur katseloomade ruumis peaks olema 22 ± 3 °C. Kuigi suhteline niiskus peaks olema vähemalt 30 % ja eelistatavalt mitte üle 70 %, v.a ruumi koristamise ajal, peaks eesmärgiks olema hoida niiskust 50–60 %. Valgustus peab olema kunstlik, 12 tundi valgust ja 12 tundi pimedust. Söötmiseks võib kasutada tavapärasest labori söödavalikut koos piiramat

▼ M5

hulga joogiveega. Söödavalikut võib mõjutada vajadus tagada uuritava kemikaali sobiv lisamine söödasse, kui kemikaali manustatakse sellisel viisil. Loomi tuleb pidada väikestes rühmades, kuni viis samast soost looma, kui ei eeldata agressiivset käitumist. Loomi võib hoida eraldi, kui see on teaduslikult põhjendatud.

Loomade ettevalmistamine

18. Terved noored suguküpsuse saavutanud täiskasvanud loomad (vanus 8–12 nädalat katse alguses) määratakse juhuvaliku alusel kontrolli- ja doosirühmadesse. Loomad varustatakse individuaalse märgisega. Loomi harjutatakse laboritingimustega vähemalt viis päeva. Puurid paigutatakse nii, et puuri paigutusest tingitud mõjud oleksid võimalikult väikesed. Uuringu alguses peaksid loomade kehamassi erinevused olema minimaalsed ja ei tohiks ületada ± 20 % kummagi soo keskmisest massist.

Dooside ettevalmistamine

19. Tahke uuritav kemikaal tuleb lahustada või suspendeerida sobivas lahustis või kandeaines ja segada sööda või joogivee sisse enne loomadele andmist. Vedelat uuritavat ainet võib manustada vahetult või lahjendada enne manustamist. Sissehingamise kaudu toimuva kokkupuute korral manustatakse uuritavat kemikaali gaasi, auru või tahke/vedela aerosoolina, sõltuvalt kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest. Tuleks kasutada uuritava kemikaali värskeid valmistisi, välja arvatud siis, kui andmed püsivuse kohta näitavad, et säilitamine on aktsepteeritav.

Katsetingimused*Lahusti/kandeaine*

20. Lahusti/kandeaine ei tohi avaldada toksilist mõju kasutatavate dooside korral ega keemiliselt reageerida uuritava ainega. Kui kasutatakse tuntud lahustist/kandeainest erinevat lahustit või ainet, peab olema võrdlusandmetega näidatud, et see on sobiv. Soovitav on võimaluse korral esimesena kaaluda vesilahuste/vee kui kandeaine kasutamist.

Positiivsed kontrollid

21. Tavaliselt tuleks kasutada paralleelselt positiivse kontrolli loomi. Labori puhul, kes on tõendanud oma pädevust (vt punkt 23) ja teeb selliseid katseid tavalises korras, võib meetodi edukuse tõenduseks lisada igasse katseesse DNA eelmisest positiivse kontrolli katsest. Selline varasema katse DNA peaks olema saadud sama loomaliigi samadest huvipakkuvatest kudedest ja see peaks olema nõuetekohaselt säilitatud (vt punkt 36). Kui kasutatakse samaaegset positiivset kontrolli, ei ole kontrollkemikaali vaja tingimata manustada samal viisil kui uuritavat kemikaali; siiski peaks positiivse kontrolli kemikaali kohta olema teada, et see põhjustab mutatsioone samas koes/samades kudedes, mis pakuvad huvi uuritava kemikaali puhul. Positiivse kontrolli kemikaali doosid tuleks valida nii, et mõju oleks nõrk või mõõdukas, et kriitiliselt hinnata katse tulemuslikkust ja tundlikkust. Positiivse kontrolli kemikaalide ja mõnede nende sihtkudede näited on esitatud tabelis 1.

▼M5

Tabel 1

Positiivse kontrolli kemikaalide ja mõnede nende sihtkude näited

Positiivse kontrolli kemikaal ja selle CASi nr	EINECSi nimetus ja EINECSi nr	Kirjeldus	Mutatsiooni sihtkude	
			Rott	Hiired
<i>N</i> -etüül- <i>N</i> -nitrosokarbaamiid [CASi nr 759-73-9]	<i>N</i> -etüül- <i>N</i> -nitrosokarbaamiid [212-072-2]	Otse toimiv mutageen	Maks, kopsud	Luuüdi, käärsool, käärsoole epiteel, sool, maks, kopsud, põrn, neerud, munasarjade granulöörakud, isaslooma sugurakud
Etüülkarbamaat (uretaan) [CASi nr 51-79-6]	Uretaan [200-123-1]	Mutageen, vajalik on metabolism, mõju on aga nõrk		Luuüdi, eelmagu, peensool, maks, kopsud, põrn
2,4-diaminotolueen [CASi nr 95-80-7]	4-metüül- <i>m</i> -fenüleendiamiin [202-453-1]	Mutageen, vajalik on metabolism, positiivne ka Spi-katses	Maks	Maks
Benso[a]püreen [CASi nr 50-32-8]	Benso[def]krüseen [200-028-5]	Mutageen, vajalik on metabolism	Maks, rasvikud	Luuüdi, rinnanääre, käärsool, eelmagu, näärmemagu, süda, maks, kopsud, isaslooma sugurakud

Negatiivsed kontrollid

22. Igal proovide võtmisel peaksid olema negatiivsed kontrollid, loomad, kellele on manustatud ainult lahustit või kandainet ja kes muidu on läbinud sama kohtlemise kui doosirühmad. Kui ei ole varasemaid või kirjanduses avaldatud kontrollandmeid, mis näitaksid, et valitud lahustil või kandainel ei ole kahjulikku ega mutageenset toimet, tuleb igal proovide võtmisel kaasata ka loomad, kellele ei ole üldse midagi manustatud, et tõendada kandaine kontrolli vastuvõetavust.

Labori pädevuse tõendamine

23. Pädevust nende katsete tegemises tuleks tõendada võimega korrata avaldatud andmetele (24) vastavaid järgmisi oodatavaid tulemusi: 1) mutatsiooni sagedus positiivse kontrolli kemikaalide puhul (kaasa arvatud nõrgatoimelised kemikaalid), nagu tabelis 1 esitatud kemikaalid, mittemutageenide puhul ja kandaine kontrolli puhul ning 2) transgeeni tagasisaamine genoomist DNA-st (nt pakendamise tõhusus).

Mutantide sekveneerimine

24. Regulaatiivsete rakenduste puhul mutantide DNA sekveneerimist ei nõuta, eriti kui on saadud selge positiivne või negatiivne tulemus. Sekveneerimine võib siiski olla kasulik, kui individuaalsete loomade vahelised erinevused on suured. Sellistel juhtudel võib järjestuse määramist kasutada nn *jackpot*'i või kloonsete sündmuste võimaluse välistamiseks: sekveneerimisega määratakse ainulaadsete mutatsioonide osakaal konkreetses koes. Ühe looma ühe koe ligikaudu 10 mutandi sekveneerimine peaks olema piisav, et lihtsalt

▼ **M5**

kindlaks teha, kas kloonmutandid võivad anda panuse mutatsioonide sagedusse; mutatsioonisageduse andmete matemaatiliseks parandamiseks klooniefektide suhtes tuleks sekveneerida kuni 25 mutanti. Mutantide sekveneerimist võib kaaluda ka siis, kui leitakse mutatsioonisageduse nõrk suurendamine (st vaid veidi rohkem mutatsioone kui kontrollkatsetes, kus kemikaali ei manustatud). Kui kemikaali saanud ja kontrollkatse mutandiklooniate spekter on erinev, võib see toetada mutageense toime oletust (29). Mutatsioonide spektrid võivad olla abiks ka toimemehhanismi käsitlevate hüpoteeside tegemisel. Kui uuringus nähakse ette sekveneerimine, tuleb uuringu kavandamisel olla eriti hoolikas, eriti ühe proovi kohta sekveneeritavate mutantide arvu määramisel, et tulemusel oleks vastavalt kasutatavale statistilisele mudelile piisav statistiline võimsus (vt punkt 43).

KATSE KORRALDUS**Loomade arv ja sugu**

25. Loomade arv igas rühmas peaks olema eelnevalt kindlaks määratud nii, et see tagaks piisava statistilise võimsuse, mis võimaldaks tuvastada vähemalt mutantide arvu kahekordistumise. Rühmas on vähemalt viis looma; kui statistiline võimsus ei ole piisav, tuleks loomade arvu vastavalt vajadusele suurendada. Tavaliselt tuleks kasutada isasloomi. Võib esineda juhtusid, kus on õigustatud üksnes emasloomade kasutamine, näiteks kui uuritakse spetsiaalselt naiste jaoks ettenähtud ravimeid või uuritakse naissoole eripäraseid metabolismi aspekte. Kui kemikaali toksilisuses või metabolismis esineb märkimisväärsed soospetsiifilisi erinevusi, on vaja uurida nii isas- kui ka emasloomi.

Manustamisperiood

26. Kuna on kindlaks tehtud, et mutatsioonid akumuleeruvad iga manustamiskorraga, on vaja kasutada korduvdoosi manustamise režiimi — manustamist iga päev 28 päeva jooksul. Seda peetakse üldiselt rahuldavaks, kuna niimoodi tekib ka nõrga mutageeniga piisavalt palju mutatsioone ja see on piisav kokkupuuteaeg mutatsioonide avastamiseks aeglaselt kasvavates organismides. Mõne hindamise puhul võib olla sobiv muu manustamisrežiim, mille kasutamist tuleks uuringu protokollis teaduslikult põhjendada. Kemikaali manustamise aeg ei tohiks olla lühem kui aeg, mis on vajalik kõikide asjakohaste metabolismiensüümide täielikuks induktsiooniks; lühema manustamisperioodi puhul võib olla vaja kasutada mitut proovide võtmise aega, mis sobivad eri kasvukiirusega organite jaoks. Igal juhul tuleks katse-eeskirja põhjendamiseks kasutada kogu kättesaadavat teavet (nt üldise toksilisuse, metabolismi ja farmakokineetika kohta), eriti kui kaldutakse kõrvale eespool esitatud standardsoovitustest. Pikemat manustamisperioodi kui 8 nädalat tuleks selgelt põhjendada ja õigustada, sest kuigi see võib suurendada katse tundlikkust, võib see põhjustada mutantide sageduse näilist suurenemist klooni kasvu tagajärjel (29).

Doositasemed

27. Doositasemed peaksid põhinema tulemustel, mis on saadud doosivahemiku leidmise katsega, milles mõõdetakse üldist mürgisust samasuguse manustamis- või kokkupuuteviisi puhul, või varasemate alaägeda mürgisuse uuringute tulemustel. Doosivahemiku leidmiseks võib kasutada sama näriliseliini mitte-transgeenseid loomi. Doosi ja toime vahelist seost käsitleva teabe saamiseks peaks täielikus põhikatses olema negatiivne kontrollrühm (vt punkt 22) ja vähemalt kolm sobiva vahemikuga doositaset, välja arvatud juhul, kui kasutatakse piirdoosi (vt punkt 28). Suurim doos peaks

▼ **M5**

vastama suurimale talutavale doosile. Suurim talutav doos on doos, mis põhjustab selliseid mürgistusenahte, et sama manustamiskava puhul põhjustaks veel suurem doos juba surma. Kemikaalid (näiteks hormoonid ja mitogeenid), millel juba madala mittetoksilise doosi juures on teatav bioloogiline aktiivsus, ja sellised kemikaalid, mille toksiko-kineetilistes omadustes esineb küllastumine, moodustavad erandi üldistest doosivaliku kriteeriumidest ja neid tuleks igal juhul hinnata konkreetselt. Doositasemetega tuleks katta kogu vahemik suurimast talutavast doosist kuni vähese mürgisuseni või mürgisuse puudumiseni.

Piirdoosikatse

28. Kui doosivahemiku leidmise katsed või lähedaste näriliseliinide andmed osutavad, et vähemalt piirdoosi manustamine ei põhjusta närilisele täheleatavaid toksilisi mõjusid ja kui struktuurilt lähedaste kemikaalide andmete põhjal ei ole karta genotoksilisust, ei tarvitse täielik uuring kolme doositasemega olla vajalik. 28-päevase manustamisperioodi (28 manustamist üks kord päevas) puhul on piirdoos 1 000 mg kehakaalu kg kohta päevas. Kui manustamisperiood on 14 päeva või lühem, on piirdoos 2 000 mg kehakaalu kg kohta päevas (dooside manustamise kavad, mis erinevad 28-päevast manustamisest, peaksid olema katseprotokollis teaduslikult põhjendatud; vt punkt 26).

Dooside manustamine

29. Uuritavat kemikaali manustatakse tavaliselt sundsöötmisega maosondi kaudu või sobiva intubeerimiskanüüli abil. Üldiselt tuleks katse kavandamisel silmas pidada inimese võimalikku kokkupuuteviisi. Seepärast võib kasutada muid kokkupuuteviise (näiteks joogiveega, nahaaluse süstiga, intravenoosselt, nahale määrimisega, sissehingamisega, trahheasse juhtimisega, söödaga või implantaadiga), kui neid saab põhjendada. Süstimist kõhukelmesse ei soovitata, kuna see ei ole inimese kokkupuute seisukohast asjakohane. Vedeliku suurim kogus, mida saab söögitoru kaudu või süstides ühel korral manustada, sõltub katselooma suurusest. Kogus ei tohiks ületada 2 ml 100 g kehamassi kohta. Suurema mahu kasutamise korral tuleb seda põhjendada. Välja arvatud ärritavad või söövitavad kemikaalid, mille mõjud tavaliselt teravnevad suuremate kontsentratsioonide korral, tuleks vähendada katse kasutatavate mahtude varieeruvust, reguleerides kontsentratsioone nii, et kogumaht kõikide dooside korral jääks samaks.

Proovivõtuaeg*Somaatilised rakud*

30. Proovide võtmise aeg on väga oluline muutuja, sest see on määratud ajavahemikuga, mis kulub mutatsioonide fikseerumiseks. See ajavahemik on koespetsiifiline ja näib olevat seotud rakupopulatsiooni uuenemisajaga; luuüdi ja soolestiku puhul on toime kiire, maksa puhul on see palju aeglasem. Sobiv kompromiss mutatsioonisageduse mõõtmiseks nii kiiresti kui ka aeglaselt kasvavate kudede korral on manustamine 28 järjestikusel päeval (vt punkt 26) ja proovide võtmine kolm päeva pärast viimast manustamist, kuigi maksimaalne mutantide sagedus ei tarvitse nendes tingimustes aeglaselt kasvavate kudede puhul veel avalduda. Kui aeglaselt kasvavad koed on eriti olulised, võib hilisem proovide võtmise aeg 28 päeva pärast 28-päevase manustamisperioodi lõppu olla kohasem (16, 29). Sellisel juhul asendaks hilisem proovivõtuaeg proovide võtmise pärast kolme päeva, ning see nõuaks teaduslikku põhjendust.

▼ **M5***Sugurakud*

31. Transgeense närilise katse sobib hästi isaslooma sugurakkudes põhjustatud mutatsioonide uurimiseks (7, 8, 27), kuna spermatogeneesi ajastust ja kineetikat on palju uuritud (27). Analüüsiks kättesaadavate munarakkude väike arv, isegi pärast superovulatsiooni, ning asjaolu, et munarakus ei toimu DNA sünteesi, välistavad transgeense närilise katse kasutamise mutatsioonide tekkimise uurimiseks emaslooma sugurakkudes (31).
32. Proovide võtmise aeg isaslooma sugurakkude puhul valitakse nii, et proovid kogutakse kõikidest kogu suguraku arengutsükli jooksul kemikaaliga kokkupuutunud rakutüüpidest; jälgitakse, et see staadium, mille proove eriti tahetakse saada, oleks piisavalt kaua kemikaaliga kokku puutunud. Aeg, mis kulub arenevatel sugurakkudel jõudmiseks spermatogooniumi tüvirakkudest küpse spermatoosidi staadiumini seemnejuhas või munandimanuse sabas, on ~49 päeva hiire (36) ja ~70 päeva roti (34, 35) puhul. Sperma, mis kogutakse pärast 28-päevast kokkupuuteperioodi ja sellele järgnevat kolmepäevast ajavahemikku proovide võtmiseni seemnejuhast ja munandimanuse sabast (7, 8), kujutab endast rakkude populatsiooni, mis on olnud kemikaaliga kokkupuutes umbes poole spermatogeneesi ajast; see spermatogeneesi lõpp-periood hõlmab meioosi ja sellele järgnevaid etappe, kuid ei hõlma spermatogooniumi- ega tüvirakuetappi. Selleks, et saada seemnejuhast ja munandimanuse sabast õigeid proove rakkudest, mis olid spermatogooniumi tüvirakud kokkupuuteperioodi ajal, tuleb pärast kemikaali manustamise lõppu proovide võtmisele eelnevale ajale lisada hiire puhul vähemalt 7 nädalat ja roti puhul 10 nädalat.
33. Pärast 28 + 3 päeva pikkust katseperioodi seemnekanalikestest väljasurutud rakud kujutavad endast segapopulatsiooni, milles on kõiki sugurakkude arengu staadiume (7, 8). Nendest rakkudest proovide võtmine geenimutatsioonide avastamiseks ei võimalda nii täpselt hinnata, millistes suguraku arengu etappides tekivad mutatsioonid, kui seemnejuhast või munandimanuse sabast kogutud spermatoosidiproovid (kuna seemnekanalikestest saadud proovis on palju sugurakutüüpe ja ka somaatilisi rakke, mis saastavad seda rakupopulatsiooni). Kuid rakuproovi võtmine seemnekanalikestest lisaks spermatoosidiproovile seemnejuhast või munandimanuse sabast pärast üksnes 28 + 3 päeva pikkust katseperioodi võimaldab saada mingid proovid kõikidest rakkudest, mis on olnud kemikaaliga kokkupuutes enamiku suguraku küpsemise faaside ajal, ja see võib olla kasulik mõnede suguraku mutageenide tuvastamiseks.

Vaatlused

34. Üldisi kliinilisi vaatlusi tuleks teha vähemalt kord päevas, soovitatavalt iga kord samal ajal ning võttes arvesse, et oodatud tulemusi esineb kõige rohkem pärast doseerimist. Üles tuleks märkida loomade tervislik seisund. Vähemalt kaks korda päevas tuleks kontrollida, ega loomad ei ole haigestunud või surnud. Kõiki loomi tuleks kaaluda vähemalt kord nädalas ja surmamisel. Sööda tarbimist tuleks mõõta vähemalt kord nädalas. Kui uuritavat kemikaali manustatakse joogiveega, tuleb vee tarbimist mõõta pärast iga veevahetust ja vähemalt üks kord nädalas. Loomad, kellel leitakse raske mürgistuse tunnuseid, mis ei ole küll surmavad, tuleks humaanselt surmata enne katse lõppu (23).

▼ **M5****Kudede kogumine**

35. Kudede kogumise põhjendus peaks olema selgelt määratletud. Kuna mutatsioonide tekkimist on võimalik uurida peaaegu igas koes, peaks kogutavate kudede valimine põhinema uuringu tegemise eesmärgil ja kõikidel uuritava kemikaali kohta saadud mutageensuse, kantserogeensuse ja mürgisuse andmetel. Olulised tegurid, mida tuleks kaaluda, peaksid hõlmama vähemalt järgmist: manustamisviisi (põhineb inimeste töenäoliselt kokkupuuteviisil), jaotumine kudedes ja võimalik toimemehhanism. Taustteabe puudumise korral tuleks koguda paljusid somaatilisi kudesid, kuna need võivad pakkuda huvi. Nende hulgas peaks olema kiiresti kasvavaid, aeglaselt kasvavaid ja kokkupuutekoha kudesid. Lisaks tuleks koguda spermatosoidide seemnejuhast ja munandimanuse sabast ning arenevaid sugurakke seemnekanalikestest (nagu on kirjeldatud punktides 32 ja 33) ja säilitada hilisema analüüsi jaoks, kui on vaja määrata mutageensust sugurakkude suhtes. Tuleks määrata elundite massid ja suuremate elundite puhul tuleks kõikidelt loomadelt koguda üks ja sama piirkond.

Kudede ja DNA säilitamine

36. Kudesid või nende homogenaate tuleb säilitada temperatuuril alla -70 °C ja kasutada DNA eraldamiseks viie aasta jooksul. Eraldatud DNA, mida säilitatakse temperatuuril 4 °C sobivas puhverlahuses, tuleks kasutada mutatsioonide analüüsiks 1 aasta jooksul.

Kudede valimine mutantide analüüsiks

37. Kudede valimisel tuleks arvestada järgmist: 1) manustamistee või esimese kokkupuute koht (nt näärmemagu suukaudsel manustamisel, kopsud sissehingamisega manustamisel, nahk, kui määratakse nahale) ja 2) farmakokiineetilised näitajad, mida vaadeldakse üldistes mürgisuse uuringutes, mis näitavad levikut kudedesse, püsimist kudedes või kogunemist kudedesse, samuti mürgisuse sihtorganid. Kui uuring tehakse kantserogeensusuuringu jätkuna, tuleks arvestada kantserogeensuse sihtkudesid. Analüüsi jaoks kudede valimisel tuleks seada eesmärgiks selliste kemikaalide tuvastamine, mis on otse toimivad *in vitro* mutageenid, mis kiiresti metaboliseeritakse, on väga reaktsioonivõimelised või neelduvad halvasti või mille sihtkude on määratud manustamisteedega (6).
38. Kui taustteavet ei ole ning võttes arvesse kokkupuute kohta, mis on määratud manustamisviisiga, tuleks mutageensust hinnata maksa ja vähemalt ühe kiiresti jaguneva koe (nt näärmemagu, luuüdi) järgi. Enamikul juhtudel võib eespool nimetatud nõuded täita kahe hoolikalt valitud koe analüüsiga, kuid mõnel juhul oleks vaja analüüsida kolme või enamat kude. Kui on põhjust eriti muretseda mõju pärast sugurakkudele, sealhulgas positiivse tulemuse pärast somaatilistes rakkudes, tuleks mutatsioonide suhtes uurida sugurakkude kudesid.

Mõõtmismeetodid

39. Standardsed avaldatud laborimeetodid mutantide avastamiseks on kättesaadavad järgmiste soovitatavate transgeenimudelite jaoks: *lacZ* λ -bakteriofaag ja -plasmiid (30); *lacI* hiir (2, 18); *gpt* delta hiir (22); *gpt* delta rott (28); *cII* (17). Muudatused peavad olema nõuetekohaselt põhjendatud ja dokumenteeritud. Mitme pakendi andmed saab koondada ja kasutada selleks, et säävutada piisav arv lüüsilaike või kolooniaid. Kui vajaliku arvu lüüsilaike saamiseks on vaja suurt arvu pakendamisreaktsioone, võib see näidata DNA halba kvaliteeti. Sellisel juhul tuleks andmeid hoolikalt kaaluda, kuna need ei tarvitse olla usaldusväärsed. Lüüsilaike või kolooniate optimaalne

▼ **M5**

koguarv DNA- proovi kohta on määratud statistilise tõenäosusega, et õnnestub kindlaks teha piisav arv mutante teatava spontaanse mutatsioonisageduse juures. Üldiselt on vaja vähemalt 125 000 — 300 000 lüüsilaiku, kui spontaanse mutatsioonisagedus on suurusjärgus 3×10^{-5} (15). Big Blue® *lacI* katse puhul on oluline näidata, et kogu mutantide värvusfenotüüpide vahemikku saab avastada; selleks lisatakse sobivad värvuse kontrollid paralleelselt igale plaadile. Koed ja saadavad proovid (näidised) tuleks töödelda ja analüüsida plokkkeemi alusel, milles lahusti/kandaine kontrollrühma, positiivse kontrolli rühma (kui seda kasutatakse) või positiivse kontrolli DNA (kui see on asjakohane) ja iga doosirühma näidised töödeldakse koos.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE**Andmete töötlemine**

40. Andmed üksikute loomade kohta esitatakse tabeli kujul. Katsetühikuks on loom. Protokollis tuleks esitada lüüsilaike moodustavate ühikute (*plaque-forming units*, PFU) või kolooniaid moodustavate ühikute (*colony-forming units*, CFU) koguarv, mutantide arv ja mutatsioonide sagedus iga looma iga koe puhul. Kui tegemist on paljude pakendamise- või vabastamisreaktsioonidega, tuleks esitada reaktsioonide arv iga DNA-näidise kohta. Andmed iga üksiku reaktsiooni kohta tuleks säilitada, kuid protokollis on vaja esitada ainult vaid PFU-de või CFU-de üldarv. Tuleks esitada andmed mürgisuse kohta ja kliinilised tunnused, vt punkt 34. Iga analüüsitud mutandi puhul tuleb esitada kõik sekveneerimisandmed, samuti nendest tulenevad mutatsioonisageduse andmed iga looma ja iga koe kohta.

Tulemuste statistiline hindamine ja tõlgendamine

41. On mitmeid kriteeriume positiivse tulemuse määramiseks, nagu muteerumissageduse suurenemine sõltuvalt kemikaali doosist või mutatsioonide sageduse selge suurenemine ühes doosirühmas, võrreldes lahusti/kandaine kontrollrühmaga. Doosi-toime sõltuvuse jaoks piisavate andmete saamiseks on vaja uurida vähemalt kolme doosirühma. Peamine arvesse võetav tegur on tulemuste bioloogiline asjakohasus, kuid katsetulemuste hindamiseks võib kasutada sobivaid statistilisi meetodeid (4, 14, 15, 25, 26). Kasutatavate statistiliste testide korral tuleks eksperimendiühikuks pidada üksiklooma.
42. Uuritavat kemikaali, millega saadavad tulemused ühegi koe puhul ei vasta eespool esitatud kriteeriumidele, peetakse käesoleva katsemeetodi kohaselt negatiivseks. Et negatiivset tulemust saaks pidada bioloogiliselt asjakohaseks, tuleks koe kokkupuudet kemikaaliga tõendada.
43. DNA sekveneerimisanalüüside puhul võib tulemuste tõlgendamisel kasutada mitmeid statistilisi lähenemisviise (1, 5, 9, 19).
44. Toime bioloogilise olulisuse hindamisel võib juhinduda sellest, kas leitud väärtused on varasemate kontrollkatsete vahemikus või väljaspool seda vahemikku (32).

▼ M5**Katseprotokoll**

45. Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav kemikaal:

- identifitseerimisandmed ja CASi nr, kui see on teada;
- allikas, partii number, kui on olemas;
- füüsikaline olek ja puhtus;
- uuringu tegemisel olulised füüsikalise-keemilised omadused;
- uuritava kemikaali stabiilsus, kui see on teada.

Lahusti/kandeaine:

- kandeaine valiku põhjendus;
- uuritava kemikaali lahustuvus ja püsivus lahustis/kandeaines, kui on teada;
- sööda, joogivee või sissehingamise kaudu manustamiseks sobiva vormi valmistamine;
- osutatud vormi analüüsid (nt, stabiilsus, ühtlus, nominaalsed kontsentratsioonid).

Katseloomad:

- kasutatud liik/liin ja selle valimise põhjendus;
- loomade arv, vanus ja sugu;
- päritolu, pidamistingimused, sööt jne;
- iga looma mass katse alustamisel, sh kehamassi vahemik, keskväärtus ja standardhälve iga rühma kohta.

Katsetingimused:

- positiivseid ja negatiivseid (lahus/kandeaine) kontrollkatseid käsitlevad andmed;
- vahemiku leidmise uuringu andmed;
- doositaseme valimise põhjendus;
- uuritud kemikaali preparaadi üksikasjad;
- uuritud kemikaali manustamise üksikasjad;
- manustamistee põhjendus;
- looma suhtes avalduva mürgisuse mõõtmise meetodid, sealhulgas histopatoloogilised või hematoloogilised analüüsid, kui need on tehtud, ja loomade vaatluste ja kehamassi määramise sagedus;
- meetodid, millega kontrolliti, et uuritav kemikaal jõudis sihtkoesse või üldvereringesse, kui tulemused olid negatiivsed;

▼ M5

- tegelik doos (mg kehakaalu kg kohta päevas), mis arvutatakse sööda/-joogivee tarbimise ja selles uuritava kemikaali sisalduse (ppm) järgi, kui see on kohaldatav;
- sööda ja vee kvaliteedi üksikasjad;
- manustamis- ja proovivõtukavade detailne kirjeldus ja nende valiku põhjendused;
- humaanse surmamise meetod;
- kudede eraldamise ja säilitamise kord;
- näriliste genoomse DNA eraldamise, transgeeni genoomsest DNA-st vabastamise ja transgeense DNA bakteriaalsesse peremeesorganismi ülekandmise meetodid;
- kõikide rakkude, katsekomplektide ja reaktiivide allikad ja partiide numbrid (vajaduse korral);
- mutantide loendamine meetodid;
- mutantide molekulaarse analüüsi, kloonsuse paranduse kasutamise ja mutatsioonide sageduse arvutamise meetodid, kui see on kohaldatav.

Tulemused:

- loomade seisund enne katset ja kogu katse ajal, sealhulgas mürgistuse tunnused;
- keha ja elundite massid surmamisel;
- iga koe ja looma kohta mutantide arv, hinnatud lüüsilaukude või kolooniate arv, mutatsioonide sagedus;
- iga koe ja loomade rühma kohta pakendamisreaktsioonide arv DNA proovi kohta, mutantide üldarv, keskmine muteerumissagedus, standardhälve;
- doosi ja toime suhe, võimaluse korral;
- iga koe ja looma kohta sõltumatute mutantide arv ja keskmine mutatsioonisagedus, kui tehti mutatsioonide molekulaarne analüüs;
- paralleelsed ja varasemad negatiivse kontrolli andmed, nende vahemikud, keskväärtused ja standardhälbed;
- paralleelse positiivse kontrolli (või mitteparalleelse positiivse kontrolli DNA) andmed;
- analüütilised määramised, kui need on kättesaadavad (nt DNA kontsentratsioon, mida kasutati pakendamisel, DNA sekveneerimise andmed);
- kasutatud statistilised analüüsid ja meetodid.

*Tulemuste arutelu**Kokkuvõte*

▼ M5

KIRJANDUS

- 1) Adams, W.T. and T.R. Skopek (1987), 'Statistical Test for the Comparison of Samples from Mutational Spectra', *J. Mol. Biol.*, 194: 391–396.
- 2) Bielas, J.H. (2002), 'A more Efficient Big Blue® Protocol Improves Transgene Rescue and Accuracy in an Adduct and Mutation Measurement', *Mutation Res.*, 518: 107–112.
- 3) Boerrigter, M.E., M.E. Dollé, H.-J. Martus, J.A. Gossen and J. Vijg (1995), 'Plasmid-based Transgenic Mouse Model for Studying *in vivo* Mutations' *Nature*, 377(6550): 657–659
- 4) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1995), 'Statistical Design and Analysis of Mutation Studies in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen*, 25(3): 246–255.
- 5) Carr, G.J. and N.J. Gorelick (1996), 'Mutational Spectra in Transgenic Animal Research: Data Analysis and Study Design Based upon the Mutant or Mutation Frequency', *Environ. Mol. Mutagen*, 28: 405–413.
- 6) Dean, S.W., T.M. Brooks, B. Burlinson, J. Mirsalis, B. Myhr, L. Recio and V. Thybaud (1999), 'Transgenic Mouse Mutation Assay Systems can Play an important Role in Regulatory Mutagenicity Testing *in vivo* for the Detection of Site-of-contact Mutagens', *Mutagenesis*, 14(1): 141–151.
- 7) Douglas, G.R., J. Jiao, J.D. Gingerich, J.A. Gossen and L.M. Soper(1995), 'Temporal and Molecular Characteristics of Mutations Induced by Ethyl-nitrosourea in Germ Cells Isolated from Seminiferous Tubules and in Spermatozoa of *lacZ* Transgenic Mice', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 7485-7489.
- 8) Douglas, G.R., J.D. Gingerich, L.M. Soper and J. Jiao (1997), 'Toward an Understanding of the Use of Transgenic Mice for the Detection of Gene Mutations in Germ Cells', *Mutation Res.*, 388(2–3): 197–212.
- 9) Dunson, D.B. and K.R. Tindall (2000), 'Bayesian Analysis of Mutational Spectra', *Genetics*, 156: 1411–1418.
- 10) Gossen, J.A., W.J. de Leeuw, C.H. Tan, E.C. Zwarthoff, F. Berends, P.H. Lohman, D.L. Knook and J. Vijg(1989), 'Efficient Rescue of Integrated Shuttle Vectors from Transgenic Mice: a Model for Studying Mutations *in vivo*', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86(20): 7971–7975.
- 11) Gossen, J.A. and J. Vijg (1993), 'A Selective System for *lacZ*-Phage using a Galactose-sensitive *E. coli* Host', *Biotechniques*, 14(3): 326, 330.
- 12) Erikson, R.P. (2003), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer', *Mutation Res.*, 543: 125–136.
- 13) Erikson, R.P. (2010), 'Somatic Gene Mutation and Human Disease other than Cancer: an Update', *Mutation Res.*, **705: 96–106**.
- 14) Fung, K.Y., G.R. Douglas and D. Krewski (1998), 'Statistical Analysis of *lacZ* Mutant Frequency Data from Muta™Mouse Mutagenicity Assays', *Mutagenesis*, 13(3): 249–255.
- 15) Heddle, J.A., S. Dean, T. Nohmi, M. Boerrigter, D. Casciano, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.C. Mirsalis, H.-J. Martus, T.R. Skopek, V. Thybaud, K.R.Tindall and N. Yajima (2000), 'In vivo Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 35: 253–259.
- 16) Heddle, J.A., H.-J. Martus and G.R. Douglas (2003), 'Treatment and Sampling Protocols for Transgenic Mutation Assays', *Environ. Mol. Mutagen.*, 41: 1–6.

▼ M5

- 17) Jakubczak, J.L., G. Merlino, J.E. French, W.J. Muller, B. Paul, S. Adhya and S. Garges (1996), 'Analysis of Genetic Instability during Mammary Tumor Progression using a novel Selection-based Assay for *in vivo* Mutations in a Bacteriophage λ Transgene Target', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(17): 9073-9078.
- 18) Kohler, S.W., G.S. Provost, P.L. Kretz, A. Fieck, J.A. Sorge and J.M. Short (1990), 'The Use of Transgenic Mice for Short-term, *in vivo* Mutagenicity Testing', *Genet. Anal. Tech. Appl.*, 7(8): 212-218.
- 19) Lewis P.D., B. Manshian, M.N. Routledge, G.B. Scott and P.A. Burns (2008), 'Comparison of Induced and Cancer-associated Mutational Spectra using Multivariate Data Analysis', *Carcinogenesis*, 29(4): 772-778.
- 20) Nohmi, T., M. Katoh, H. Suzuki, M. Matsui, M. Yamada, M. Watanabe, M. Suzuki, N. Horiya, O. Ueda, T. Shibuya, H. Ikeda and T. Sofuni (1996), 'A new Transgenic Mouse Mutagenesis Test System using Spi⁻ and 6-thioguanine Selections', *Environ. Mol. Mutagen.*, 28(4): 465-470.
- 21) Nohmi, T., M. Suzuki, K. Masumura, M. Yamada, K. Matsui, O. Ueda, H. Suzuki, M. Katoh, H. Ikeda and T. Sofuni (1999), 'Spi⁻ Selection: an Efficient Method to Detect γ -ray-induced Deletions in Transgenic Mice', *Environ. Mol. Mutagen.*, 34(1): 9-15.
- 22) Nohmi, T., T. Suzuki and K.I. Masumura (2000), 'Recent Advances in the Protocols of Transgenic Mouse Mutation Assays', *Mutation Res.*, 455(1-2): 191-215.
- 23) OECD (2000), Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation, Series on Testing and Assessment, N°19, ENV/JM/MONO(2000)7, OECD, Paris.
- 24) OECD (2009), Detailed Review Paper on Transgenic Rodent Mutation Assays, Series on Testing and Assessment, N° 103, ENV/JM/MONO(2009)7, OECD, Paris.
- 25) Piegorsch, W.W., B.H. Margolin, M.D. Shelby, A. Johnson, J.E. French, R.W. Tennant and K.R. Tindall (1995), 'Study Design and Sample Sizes for a lacI Transgenic Mouse Mutation Assay', *Environ. Mol. Mutagen.*, 25(3): 231-245.
- 26) Piegorsch, W.W., A.C. Lockhart, G.J. Carr, B.H. Margolin, T. Brooks, ... G.R. Douglas, U.M. Liegibel, T. Suzuki, V. Thybaud, J.H. van Delft and N.J. Gorelick (1997), 'Sources of Variability in Data from a Positive Selection lacZ Transgenic Mouse Mutation Assay: an Interlaboratory Study', *Mutation. Res.*, 388(2-3): 249-289.
- 27) Singer, T.M., I.B. Lambert, A. Williams, G.R. Douglas and C.L. Yauk (2006), 'Detection of Induced Male Germline Mutation: Correlations and Comparisons between Traditional Germline Mutation Assays, Transgenic Rodent Assays and Expanded Simple Tandem Repeat Instability Assays', *Mutation. Res.*, 598: 164-193.
- 28) Toyoda-Hokaiwado, N., T. Inoue, K. Masumura, H. Hayashi, Y. Kawamura, Y. Kurata, M. Takamune, M. Yamada, H. Sanada, T. Umemura, A. Nishikawa and T. Nohmi (2010), 'Integration of *in vivo* Genotoxicity and Short-term Carcinogenicity Assays using F344 gpt delta Transgenic Rats: *in vivo* Mutagenicity of 2,4-diaminotoluene and 2,6-diaminotoluene Structural Isomers', *Toxicol. Sci.*, 114(1): 71-78.
- 29) Thybaud, V., S. Dean, T. Nohmi, J. de Boer, G.R. Douglas, B.W. Glickman, N.J. Gorelick, J.A. Heddle, R.H. Heflich, I. Lambert, H.-J. Martus, J.C. Mirsalis, T. Suzuki and N. Yajima (2003), '*In vivo* Transgenic Mutation Assays', *Mutation Res.*, 540: 141-151.
- 30) Vijg, J. and G.R. Douglas (1996), 'Bacteriophage λ and Plasmid lacZ Transgenic Mice for studying Mutations *in vivo*' in: G. Pfeifer (ed.), *Technologies for Detection of DNA Damage and Mutations, Part II*, Plenum Press, New York, NY, USA, pp. 391-410.

▼ **M5**

- 31) Yauk, C.L., J.D. Gingerich, L. Soper, A. MacMahon, W.G. Foster and G.R. Douglas (2005), 'A *lacZ* Transgenic Mouse Assay for the Detection of Mutations in Follicular Granulosa Cells', *Mutation Res.*, 578(1-2): 117-123.
- 32) Hayashi, M., K. Dearfield, P. Kasper, D. Lovell, H.-J. Martus, V. Thybaud (2011), 'Compilation and Use of Genetic Toxicity Historical Control Data', *Mutation Res.*, doi:10.1016/j.mrgentox.2010.09.007.
- 33) OECD (2011), *Retrospective Performance Assessment of OECD Test Guideline on Transgenic Rodent Somatic and Germ Cell Gene Mutation Assays*, Series on Testing and Assessment, N° 145, ENV/JM/MONO(2011)20, OECD, Paris.
- 34) Clermont, Y. (1972), 'Kinetics of spermatogenesis in mammals seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal'. *Physiol. Rev.* 52: 198-236.
- 35) Robaire, B., Hinton, B.T., and Oregbin-Crist, M.-C. (2006), 'The Epididymis', in Neil, J.D., Pfaff, D.W., Chalis, J.R.G., de Kretser, D.M., Richards, J.S., and P. M. Wassarman (eds.), *Physiology of Reproduction*, Elsevier, the Netherlands, pp. 1071-1148.
- 36) Russell, L.B. (2004), 'Effects of male germ-cell stage on the frequency, nature, and spectrum of induced specific-locus mutations in the mouse', *Genetica*, 122: 25-36.

▼ **M5****Liide****MÕISTED**

Alusepaari asendumine – mutatsioonitüüp, mille tulemusel üksainus DNA nukleotiidipaar asendub muu nukleotiidipaariga.

Cos-sait – 12 nukleotiidi pikkune üheaheelaline DNA-lõik, mis asub λ-bakteriofaagi kaheaheelalise genoomi mõlemas otsas.

Deletsioon – mutatsioon, millega genoomist läheb kaduma üks nukleotiid või (järjestikuste) nukleotiidide lõik.

Ekstrabinomiaalne variatsioon – populatsiooni osatähtsuse korduvate hindamiste suurem varieeruvus, kui võiks oodata juhul, kui populatsioonil on binomiaaljaotus.

Elektroporeerimine – elektriimpulsside kasutamine rakumembraanide läbilaskvuse suurendamiseks.

Endogeenne geen – genoomile algselt omane geen.

Insertsioon – genoomile ühe nukleotiidse alusepaari või (järjestikuste) nukleotiidsete alusepaaride lõigu lisamine.

Jackpot – suur arv mutante, mis on tekkinud ühestainsast mutatsioonist kloni kasvu tulemusel.

Kapsiid – valgukest, mis ümbritseb viiruseosakest.

Kemikaal – aine või segu.

Kloni kasv – paljude rakkude tekkimine ühestainsast (muteerunud) rakust.

Kolooniaid moodustav ühik (*colony-forming unit*, CFU) – eluvõimeliste bakterite arvu näitav suurus.

Konkatameer – pikk pidev biomolekul, mis koosneb paljudest ahelaks ühendatud ühesugustest koopiatest.

Ligeerimine – DNA-molekulide kahe otsa kovalentne linkimine DNA-ligaasi toimel.

Lüüsilaukused moodustav ühik (*plaque forming unit*, PFU) – eluvõimeliste bakteriofaagide arvu näitav suurus.

Manustamisperiood – kogu ajavahemik, mille jooksul loomale manustatakse kemikaalidoose.

Mitogeen – kemikaal, mis stimuleerib rakku alustama jagunemist ja käivitab sellega mitoosi (raku jagunemise).

Neutraalne geen – geen, mida ei mõjuta ei positiivne ega negatiivne selektsiooniline surve.

Pakendamine – nakatamisvõimeliste faagiosakeste sünteesimine faagi kapsiidi ja faagi saba valkude valmistisest ning faagi DNA-molekulide konkatameerist. Kasutatakse tavaliselt kloonitud DNA pakendamiseks λ-vektoris (mis on eraldatud cos-saitidega), et saada nakatamisvõimelised λ-osakesed.

Pakendamise tõhusus – tõhusus, millega pakendatud bakteriofaagid leitakse peremeesbakterites.

Positiivne selektsioon – meetod, mille puhul jäetakse ellu üksnes mutandid.

▼ M5

Proovivõtuaeg – surmamisele eelneva ajavahemiku lõpp, mille kestel kemikaali ei manustata ja parandamata DNA-kahjustused fikseeruvad püsivateks stabiilseteks mutatsioonideks.

Punktmutatsioon – üldine termin, millega tähistatakse üksnes väikeses DNA-lõigus toimunud mutatsiooni, hõlmab insertioone, deletsioone ja alusepaari asendumisi.

Raaminihke mutatsioon – geneetiline mutatsioon, mis tekib valku või peptiidi kodeerivas DNA-järjestuses, kui insertiooniga on lisatud või deletsiooniga eemaldatud selline arv nukleotiide, mida ei saa jäägita jagada kolmega.

Reportergeen – geen, mille mutantne geenisaadus on kergesti avastatav.

Suur deletsioon – DNA-st mitme tuhande alusepaari väljalangemine (mida saab tõhusalt kindlaks teha *Sp1*-selektiooni ja *lacZ*-plasmidi katsega).

Süstikvektor – selliselt konstrueeritud vektor, mis saab paljuneda kahes erinevas peremeesliigis; tänu sellele saab süstikvektoris sisestatud DNA-d tuvastada või muuta kahes erinevat tüüpi rakus või kahes erinevas organismis.

Transgeenne – iseloomustab organismi, mille genoomi on muudetud sellesse muu liigi geeni või geenide sisseviimisega, või on sellega seotud.

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼B**C OSA: KESKKONNAMÜRGISUSE MÄÄRAMISE MEETODID**

SISUKORD

- C.1. ÄGE MÜRGISUS KALADELE
- C.2. *DAPHNIA* SP. LIIKUMISVÕIME AKU
UTSE PÄRSSIMISE KATSE
- C.3. MAGEVEEVETIKATE JA TSÜANOBAKTERITE KASVU
PIDURDAMISE KATSE
- C.4. KOHESE BIOLAGUNDUVUSE MÄÄRAMINE
- I OSA. ÜLDPÕHIMÕTTED
- II OSA. DOC KÕRVALDAMISE KATSE (meetod C.4-A)
- III OSA. MUUDETUD OECD SÕELKATSE (meetod C.4-B)
- IV OSA. CO₂ ERALDUMISE KATSE (meetod C.4-C)
- V OSA. MANOMEETRILISE RESPIROMEETRIA KATSE (meetod C.4-D)
- VI OSA. KINNISE PUDELI KATSE (meetod C.4-E)
- VII OSA. MITI KATSE (meetod C.4-F)
- C.5. LAGUNEMINE – BIOKEEMILINE HAPNIKUTARVE
- C.6. LAGUNEMINE – KEEMILINE HAPNIKUTARVE
- C.7. LAGUNEMINE – ABIOOTILINE LAGUNEMINE: HÜDRO-
LÜÜSI SÕLTUVUS pHst
- C.8. TOKSILISUS VIHMAUSSIDELE – TEHISMULLA TEST
- C.9. BIODEGRADATSIOON – ZAHNI-WELLENSI TEST
- C.10. REOVEE AEROOBSE TÖÖTLEMISE SIMULATSIOONI-
KATSE: C.10-A: AKTIIVMUDA – C.10-B: BOKILED
- C.11. BIODEGRADATSIOON – AKTIIVMUDA RESPIRATSIOONI
PÄRSSIMISE TEST
- C.12. BIODEGRADATSIOON – MODIFITSEERITUD SCAS TEST
- C.13. BOKONTSENTRATSIOON: KALADEGA LÄBIVOOLU-
KATSE
- C.14. NOORKALADE KASVUKATSE
- C.15. KALA EMBRÜO JA REBUKOTIGA VASTSETEGA TEHTAV
LÜHIAJALINE TOKSILISUSE KATSE
- C.16. MESILASED – AKUUTSE SUUKAUDSE TOKSILISUSE
KATSE
- C.17. MESILASED – AKUUTSE KONTAKTTOKSILISUSE KATSE
- C.18. ADSORPTSIOON/DESORPTSIOON, KASUTADES PARTII
TASAKAALUSTAMISE MEETODIT

▼B

- C.19. ADSORPTSIOONITEGURI (K_{OC}) KINDLAKSMÄARAMINE-MULLAS JA REOVEESETTES KÕRGSURVEVEDELIKKROMATOGRAAFIA (HPLC) ABIL
- C.20. HIIDKIIVRIKU (*DAPHNIA MAGNA*) SIGIVUSE KATSE
- C.21. MULLAMIKROOBID: LÄMMASTIKU TRANSFORMATSIOONI KATSE
- C.22. MULLAMIKROOBID: SÜSINIKU TRANSFORMATSIOONI KATSE
- C.23. AEROOBNE JA ANAEROOBNE TRANSFORMATSIOON MULLAS
- C.24. AEROOBNE JA ANAEROOBNE TRANSFORMATSIOON PÕHJASETTES
- C.25. AEROOBNE MINERALISEERUMINE PINNAVEES – BIOLAGUNEMISE MUDELKATSE
- C.26. LEMLE *LEMNA* SP. KASVU PIDURDAMISE KATSE

▼M4

- C.27. SETTE-VEE MÜRGISUSKATSE SURUSÄÄSKLASTEL RIKASTATUD SETTE KASUTAMISEGA
- C.28. SETTE-VEE MÜRGISUSKATSE SURUSÄÄSKLASTEL RIKASTATUD VEE KASUTAMISEGA
- C.29. KIIRE BIOLAGUNDATAVUS – CO₂ SULETUD NÕUDES (VABARUUMI KATSE)
- C.30. BIOAKUMULATSIOON MULLA VÄHEHARJASUSSIDES

▼B**C.1. ÄGE MÜRGISUS KALADELE****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Katses määratakse aine äge surmav mürgisus mageveekaladele. Katse kestel testaine piisavalt püsiva kontsentratsiooni tagamiseks parima katsemeetodi (seisva, poolseisva veega või läbivooluga katse-süsteem) valimisel on kasulik teada võimaluse korral aine lahustu-vust vees, aururõhku, keemilist stabiilsust, dissotsiatsioonikonstante ja biolagunduvust.

Katse kavandamisel ja tulemuste tõlgendamisel tuleks arvestada ka muid andmeid (näiteks struktuurivalemit, puhtusastet, peamiste lisan-dite iseloomu ja protsentuaalset sisaldust, lisaainete olemasolu ja koguseid ning oktanooli/vee jaotustegurit).

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Äge mürgisus on märgatav kahjulik mõju, mis avaldub organismis lühikese aja (päevade) jooksul pärast ainega kokkupuudet. Käesole-vas katses väljendatakse ägedat mürgisust keskmise surmava kont-sentratsioonina (LC_{50}), see tähendab kontsentratsioonina vees, mis surmab kindla katkematu kokkupuuteaja (mis peab olema märgitud) jooksul 50 % katses kasutatud kaladest.

Kõiki testaine kontsentratsioone väljendatakse massiühikutes mahuü-hiku kohta (milligrammides liitri kohta). Neid võib väljendada ka massiühikutes massiühiku kohta (mg/kg^{-1}).

1.3. VÕRDLUSAINED

Katses võib kasutada võrdlusainet näitamaks, et katseliigi reaktsioon ei ole laboratoorsetes katsetingimustes oluliselt muutunud.

Käesoleva katse jaoks ei ole võrdlusaineid nimetatud.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Kontsentratsioonil 100 mg/l võib teha piirsalduskatse näitamaks, et LC_{50} on sellest kontsentratsioonist kõrgem.

Kalad viiakse 96 tunniks kokkupuutesse veele kindlaksmääratud kontsentratsioonides lisatud testainega. Suremus registreeritakse vähemalt iga 24 tunni tagant ja igas vaatluspunktis arvutatakse võimaluse korral kontsentratsioon, mis surmab 50 % kaladest (LC_{50}).

1.5. KVALITEEDINÕUDED

Kvaliteedinõuded kehtivad nii piirsalduskatse kui ka täiskatsepro-grammi suhtes.

Kontrollkatsete suremus ei tohi katse lõpuks ületada 10 % (alla kümne kala kasutamisel võib surra vaid üks kala).

Lahustunud hapniku kontsentratsioon peab kogu katse kestel olema kõrgem kui 60 % küllastusväärtusest.

▼B

Testaine kontsentratsioon peab kogu katse kestel olema vähemalt 80 % algkontsentratsioonist.

Katsekeskkonnas hästi lahustuvaid ja püsivaid lahuseid, st arvestataval määral mitte lenduvaid, lagunevaid, hüdrolüüsuvaid ega adsorbeeruvaid lahuseid andvate ainete puhul võib algkontsentratsiooni lugeda võrdseks nimikontsentratsiooniga. Kontsentratsiooni püsivust kogu katse kestel ja kvaliteedinõuete täitmist tuleb tõendada.

Ainete puhul, mis:

- i) on katsekeskkonnas vähelahustuvad või
- ii) moodustavad stabiilseid emulsioone või dispersioone või
- iii) ei ole vesilahuses stabiilsed,

loetakse algkontsentratsiooniks lahuses mõõdetud kontsentratsioon (või veesambas mõõdetud kontsentratsioon, kui lahuses mõõtmine ei ole tehniliselt võimalik). Kontsentratsioon mõõdetakse pärast mõningast tasakaalustumist, kuid enne kalade lahusesse viimist.

Kõigil neil juhtudel tuleb katse kestel teha täiendavaid mõõtmisi, mis kinnitaksid tegelikku kokkupuutekontsentratsiooni ja kvaliteedinõuete täitmist.

pH ei tohiks kõikuda rohkem kui ühe ühiku võrra.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

Kasutada võib kolme tüüpi katseskeemi.

Seisva veega katsesüsteem:

mürgisuse katse ilma katselahuse läbivooluta (lahus ei vahetu katse kestel).

Poolseisva veega katse:

katse ilma katselahuse läbivooluta, kuid regulaarse katselahuse osakaupa vahetamisega pikemate perioodide (nt 24 tunni) järel.

Läbivooluga katse:

mürgisuse katse, mille puhul vesi katsekambrites pidevalt vahetub, kusjuures koos vahetusveega viiakse katsekambritesse ka uuritav kemikaal.

1.6.1. Reaktiivid

1.6.1.1. Testainete lahused

Vajaliku kontsentratsiooniga põhilahused valmistatakse aine lahustamisel deioniseeritud vees või punktile 1.6.1.2 vastavas vees.

Vajaliku kontsentratsiooniga katselahused valmistatakse põhilahuse lahjendamisel. Kõrgete kontsentratsioonide uurimisel võib aine lahustada otse lahjendusvees.

▼B

Aineid kontrollitakse üldjuhul lahustuvuse piirini. Mõnede ainete puhul (nt vees vähelahustuvate, kõrge P_{OW} -ga või vees pigem stabiilse dispersiooni kui tõelise lahuse moodustavate ainete puhul) võib katse teha aine lahustuvuspiirist kõrgemal kontsentratsioonil, et tagada kõrgeima lahustuva/stabiilse kontsentratsiooni saavutamine. Samas on oluline, et see kontsentratsioon ei häiriks katsesüsteemi muul moel (nt nii, et aine kile vee pinnal takistab hapniku lahustumist vees jne).

Vees vähelahustuvate ainete põhilahuste valmistamisel või nende dispergeerimisel katsekeskkonnas võib abivahendina kasutada ultrahelidispergeerimist, orgaanilisi lahusteid, emulgaatoreid või dispergaatoreid. Selliste abianete kasutamisel peavad kõik katsekontsentratsioonid sisaldama sama koguse abianet ja täiendavad kontrollikalad tuleks viia kokkupuutesse katseeriaga võrdväärse abiaine kontsentratsiooniga. Seesuguste abianete kontsentratsioon katsekeskkonnas peaks olema minimaalne ega tohiks mingil juhul ületada 100 mg/l.

Katse tuleks teha ilma pH-d reguleerimata. Märgatavate pH muutuste ilmnmisel on soovitatav katset reguleeritava pH-ga korrata ja esitada korduskatse tulemused. Eriliste vastunäidustuste puudumisel tuleks sellisel juhul põhilahuse pH reguleerida võrdseks lahjendusvee omaga. Eelistatav on selleks kasutada HCl ja NaOH. pH-d tuleb reguleerida nii, et testaine kontsentratsioon põhilahuses märgatavalt ei muutu. Ära tuleks märkida pH reguleerimisest tingitud võimalikud keemilised reaktsioonid või sademe teke.

1.6.1.2. *Pidamis- ja lahjendusvesi*

Kasutada võib kraanivett (milles ei leidu ohtlikus kontsentratsioonis kloori, raskmetalle ega muid aineid), kvaliteetset looduslikku vett või taastatud vett. Eelistada tuleks vett üldkaredusega 10–250 mg/l (arvestatud CaCO_3 -na) ja pH-ga 6,0–8,5.

1.6.2. **Seade**

Kõik seadme osad peavad olema valmistatud keemiliselt inertsest materjalist:

— automaatne lahjendussüsteem (läbivooluga katses);

— hapnikumõõtur;

— vee kareduse määramise seade;

— asjakohane termoregulaator;

— pH-meeter.

1.6.3. **Katses kasutatavad kalad**

Kalad peaksid olema terved ja nähtavate väärarenguteta.

▼B

Kasutatav liik tuleks valida praktiliste kaalutluste põhjal, näiteks aastaringse kättesaadavuse, vähese hooldusvajaduse ja hõlpsa katses kasutatavuse põhjal, tundlikkuse põhjal kemikaalide suhtes ja mis tahes asjaomaste majanduslike, bioloogiliste või ökoloogiliste tegurite põhjal. Kalaliigi valikul tuleks silmas pidada andmete võrreldavust ja olemasolevaid rahvusvahelisi kooskõlastusi (viide 1).

Soovitavate katses kasutatavate liikide nimekiri on esitatud 2. liites; eelistatavad liigid on sebrakala ja vikerforell.

1.6.3.1. *Pidamine*

Katses kasutatavad kalad peaksid olema pärit ühest allikast ja olema sarnase pikkuse ja vanusega. Kalu tuleb vähemalt 12 päeva pidada järgmistel tingimustel:

katseaine sisaldus:

vastavalt süsteemile (tsirkulatsiooni või läbivooluga) ja kalaliigile,

vesi:

vt 1.6.1.2,

valgus:

12–16 tundi päevas,

lahustunud hapniku kontsentratsioon:

vähemalt 80 % küllastusväärtusest,

söötmine:

kolm korda nädalas või iga päev, söötmine lõpetatakse 24 tundi enne katset.

1.6.3.2. *Suremus*

Pärast 48tunnist stabiliseerumisperioodi registreeritakse suremus ja rakendatakse järgmiseid kriteeriume:

— üle 10 % populatsioonist seitsme päeva jooksul:

kalad loetakse sobimatuks;

— 5–10 % populatsioonist:

kalu jälgitakse veel seitse päeva.

Kui suremust rohkem ei esine, on kalad sobivad, vastasel juhul loetakse need sobimatuks;

— alla 5 % populatsioonist:

kalad loetakse sobivaks.

1.6.4. **Kohandumisperiood**

Kõiki kalu tuleb enne katset pidada vähemalt seitse päeva katsetingimustele vastavas vees katsetingimustele vastaval temperatuuril.

▼B1.6.5. **Katse käik**

Lõplikule katsele võib eelneada annusevahemiku leidmise katse, kus kogutakse andmeid katses kasutatava kontsentratsioonivahemiku kohta.

Lisaks katseeriale tehakse üks kontrollkatse ilma testaineta ja vajaduse korral ka üks kontrollkatse abiainet sisaldava lahusega.

Vastavalt katseühendi füüsikalise-keemilistele omadustele valitakse kvaliteedinõuete täitmiseks seisva veega, poolseisva veega või läbivooluga katseüsteem.

Kalad viiakse testainega kokkupuutesse allpool kirjeldatud moel:

- kestus: 96 tundi;
- isendite arv: iga kontsentratsiooni kohta vähemalt seitse;
- mahutid: küllaldase mahuga soovitatava koguse jaoks;
- katseaine sisaldus: seisva veega ja poolseisva veega katseüsteemis on suurim soovitatav sisaldus 1 g/l, läbivooluga süsteemides võib see olla suurem;
- katsekontsentratsioon: kasutatakse vähemalt viit kontsentratsiooni, mis erinevad üksteisest konstantse teguri (kuni 2,2) võrra ja mis võimaluse korral hõlmavad kogu suremusvahemikku 0–100 %;
- vesi: vt 1.6.1.2;
- valgus: 12–16 tundi päevas;
- temperatuur: vastavalt liigile (2. liide), kuid ei tohi ühegi katse kestel kõikuda rohkem kui ± 1 °C;
- lahustunud hapniku kontsentratsioon: vähemalt 60 % küllastusväärtusest antud temperatuuril;
- söötmine: ei söödeta.

Kalu vaadeldakse esimese 2–4 tunni pärast ja seejärel vähemalt iga 24 tunni järel. Kalad loetakse surnuks, kui sabavarre puudutamine ei kutsu esile reaktsiooni ja puuduvad nähtavad hingamisliigutused. Surnud kalade avastamisel need kõrvaldatakse ja suremus registreeritakse. Registreeritakse ka nähtavad kõrvalekalded (nt tasakaalu puudumine, muutused ujumiskäitumises, hingamisfunktsioonis või pigmentatsioonis jne).

Iga päev tuleb mõõta pH-d, lahustunud hapniku kontsentratsiooni ja temperatuuri.

Piirsalduskatse

Käesoleva katsemeetodi protseduuri järgides võib kontsentratsioonil 100 mg/l teha piirsalduskatse näitamaks, et LC₅₀ on sellest kontsentratsioonist kõrgem.

Kui aine iseloom välistab kontsentratsiooni 100 mg/l saavutamise katses kasutatavas vees, tuleks piirsalduskatse teha kontsentratsioonil, mis on võrdne aine lahustuvusega kasutatavas keskkonnas (või kõrgeimal kontsentratsioonil, kus moodustub stabiilne disperioon) (vt ka punkti 1.6.1.1).

▼B

Piirsalduskatses tuleks kasutada 7–10 kala ja samapalju kontrollkalu. (Binomiaalteooria kohaselt võib 99,9 % tõenäosusega väita, et kui 10 kalaga katses on suremus null, siis on LC_{50} piirsalduskatses kasutatud kontsentratsioonist kõrgem. 7, 8 või 9 kala puhul näitab suremuse puudumine vähemalt 99 % tõenäosusega seda, et LC_{50} on kasutatud kontsentratsioonist kõrgem.)

Suremuse esinemisel tuleb teha täiemahuline uuring. Subletaalse toime avaldumisel tuleks see registreerida.

2. ANDMED JA HINDAMINE

Iga vaatlustulemuste registreerimise ajavahemiku puhul (24, 48, 72 ja 96 tundi) tuleb näidata iga soovitatava kokkupuuteperioodi kohta logaritmilisel diagrammil graafiliselt suremusprotsendi sõltuvus kontsentratsioonist.

Võimaluse korral tuleks iga vaatlushetke kohta leida standardmeetodeid kasutades hinnanguline LC_{50} väärtus ja usalduspiirid ($p = 0,05$); need väärtused tuleks ümardada ühe või maksimaalselt kahe tüvenumbrini (kahe tüvenumbrini ümardamise näited: 173,5 → 170; 0,127 → 0,13; 1,21 → 1,2).

Juhtudel, kus kontsentratsiooni/protsentuaalse reaktsiooni kõvera tõus on LC_{50} arvutamiseks liiga suur, piisab selle väärtuse graafilisest hindamisest.

Kui kahe järjestikuse, 2,2kordse vahega kontsentratsiooni suremus on vastavalt 0 ja 100 %, piisab LC_{50} vahemiku näitamiseks neist kahest väärtusest.

Kui täheldatakse, et testaine stabiilsust või homogeensust ei ole võimalik säilitada, tuleks see ära märkida ja olla tulemuste tõlgendamisel ettevaatlik.

3. ARUANDLUS

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- andmeid katses kasutatavate kalade kohta (teaduslikku nimetust, liini, päritolu, mis tahes eelnevat mõjutamist ning igal katsekontsentratsioonil kasutatud kalade suurust ja arvu);
- lahjendusvee päritolu ja peamisi keemilisi näitajaid (pH, karedus, temperatuur);
- vees vähelahustuva aine puhul põhi- ja katselahuste valmistamise meetodit;
- kõigi abiainete kontsentratsiooni;
- kasutatud kontsentratsioone ja kõiki olemasolevaid andmeid uuritava kemikaali kontsentratsioonide stabiilsuse kohta katselahuses;
- keemiliste analüüside tegemisel kasutatud meetodeid ja saadud tulemusi;
- piirsalduskatse tulemusi, kui see tehti;
- kasutatud katsemeetodi valiku põhjusi ja meetodi üksikasju (nt seisva veega, poolseisva veega katsesüsteem, annustamiskiirus, läbivoolu kiirus, aeratsioon, kalade hulk jne);

▼B

- katseseadmete kirjeldust;
- valgusrežiimi;
- katselahuste hapnikusisaldust, pH väärtusi ja temperatuuri iga 24 tunni järel;
- tõendeid kvaliteedinõuete täitmise kohta;
- tabelit kumulatiivse suremuse kohta igal kontsentratsioonil ja kontrollkatses (ja vajaduse korral abiainega kontrollkatses) kõigil soovitatud vaatlushetkedel;
- kontsentratsiooni/protsentuaalse reaktsioonikõvera graafikut katse lõpus;
- võimaluse korral LC₅₀ väärtusi kõigil soovitatud vaatlushetkedel (95 % usalduspiiridega);
- LC₅₀ määramisel kasutatud statistilisi meetodeid;
- võrdlusainete kasutamisel nendega saadud tulemusi;
- kõrgeimat katsekonsentratsiooni, mille puhul katse kestel suremust ei esinenud;
- madalaimat katsekonsentratsiooni, mille puhul suremus katse kestel oli 100 %.

4. **VIITED**

- 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 für Probenahme und Normung von Wasseruntersuchungsmethoden – Part II 1974.
- 6) DIN Testverfahren mit Wasserorganismen, 38 412 (L1) 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 Committee on Methods for Toxicity Tests with Aquatic Organisms, Ecological Research Series EPA-660-75-009, 1975.
- 10) Environmental Protection Agency, Environmental monitoring and support laboratory, Office of Research and Development, EPA-600/4-78-012, January 1978.

▼B

- 11) Environmental Protection Agency, Toxic Substance Control, Part IV, 16 March 1979.
- 12) Standard methods for the examination of water and wastewater, fourteen edition, APHA-AWWA-WPCF, 1975.
- 13) Commission of the European Communities, Inter-laboratory test programme concerning the study of the ecotoxicity of a chemical substance with respect to the fish. EEC Study D.8368, 22 March 1979.
- 14) Verfahrensvorschlag des Umweltbundesamtes zum akuten Fisch-Test. Rudolph, P. und Boje, R. Okotoxikologie, Grundlagen für die okotoxikologische Bewertung von Umweltchemikalien nach dem Chemikaliengesetz, ecomed 1986.986.
- 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. Methods for calculating an LC₅₀. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I.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 LC₅₀. US EPA.

▼B*1. liide***Taastatud vesi***Sobiva lahjendusvee näited*

Kõik kemikaalid peavad olema analüüsi puhtad.

Vesi peaks olema kvaliteetne destilleeritud vesi või deioniseeritud vesi juhtivusega alla $5 \mu\text{S}/\text{cm}^{-1}$.

Vee destilleerimise seade ei tohi sisaldada vaskosi.

Põhilahused

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (kaltsiumkloriidihüdraat): 11,76 g

Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (magneesiumsulfaatheptahüdraat): 4,93 g

Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.

NaHCO_3 (naatriumvesinikkarbonaat): 2,59 g

Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.

KCl (kaaliumkloriid): 0,23 g

Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.

Taastatud lahjendusvesi

25 ml kõigist neljast põhilahusest segatakse kokku ja täiendatakse veega 1 liitrini.

Aereeritakse, kuni hapnikusisaldus jõuab küllastuskontsentratsioonini.

pH peaks olema $7,8 \pm 0,2$.

Vajaduse korral reguleeritakse pH-d NaOH (naatriumhüdroksiidi) või HCl-ga (vesinikkloriidhappega).

Sel viisil valmistatud lahjendusvett lastakse 12 tundi seista ja seda ei tohi enam aereerida.

Ca ja Mg ionide summaarne kogus selles lahuses on 2,5 mmol/l. Ca:Mg ionide suhe on 4:1 ja Na:K ionide suhe 10:1. Lahuse üldleelisus on 0,8 mmol/l.

Ükski kõrvalekalle lahjendusvee valmistamisprotseduurist ei tohi muuta vee koostist või omadusi.

▼B

2. liide

Katseks soovitatavad kalaliigid

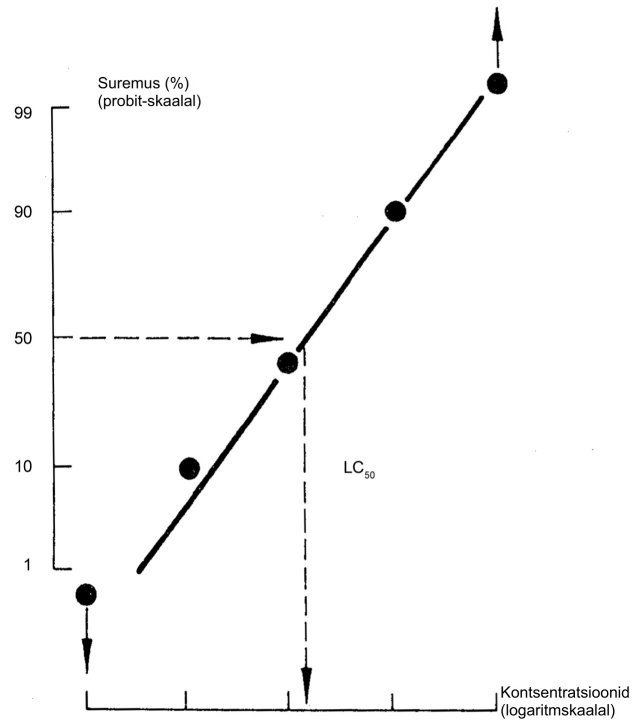
Soovitatav liik	Soovitatav katse- temperatuuride vahemik (°C)	Soovitatav katsei- sendi täispikkus (cm)
<i>Brachydanio rerio</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Hamilton-Buchanan) Sebrakala	20–24	3,0 ± 0,5
<i>Pimephales promelas</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Rafinesque) Pakspea lepamaim	20–24	5,0 ± 2,5
<i>Cyprinus carpio</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Linneaus 1758) Sasaan	20–24	6,0 ± 2,0
<i>Oryzias latipes</i> (<i>Teleostei, Poeciliidae</i>) <i>Cyprinodontidae</i> (Tomminck ja Schlegel 1850) Riisikala	20–24	3,0 ± 1,0
<i>Poecilia reticulata</i> (<i>Teleostei, Poeciliidae</i>) (Peters 1859) Gupi	20–24	3,0 ± 1,0
<i>Lepomis macrochirus</i> (<i>Teleostei, Centrarc-</i> <i>hidae</i>) (Rafinesque Linneaus 1758) Suur päikeseahven	20–24	5,0 ± 2,0
<i>Onchorhynchus mykiss</i> (<i>Teleostei, Salmo-</i> <i>nidae</i>) (Walbaum 1988) Vikerforell	12–17	6,0 ± 2,0
<i>Leuciscus idus</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Linneaus 1758) Harilik säinas	20–24	6,0 ± 2,0

Kogumine

Eespool loetletud kalu on lihtne kasvatada ja/või neid on võimalik aasta läbi hankida. Neid on võimalik aretada ja kasvatada kalakasvandustes või laboris, tingimustes, kus haigused ja parasiidid on kontrolli all, nii et katses kasutatav isend on terve ja tema põlvnemine teada. Need kalad on saadaval mitmel pool maailmas.

▼B

3. liide

Kontsentratsiooni näide: suremusprotsendi sõltuvusNäide LC_{50} määramise kohta logaritmilise probit-diagrammi abil

▼B**C.2. DAPHNIA SP. LIIKUMISVÕIME AKUUTSE PÄRSSIMISE KATSE****1. MEETOD**

Käesolev liikumisvõime akuutse pärssimise katsemeetod vastab suunisele OECD TG 202 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolevas metoodikas kirjeldatakse akuutse toksilisuse katset kemikaalide toime hindamiseks vesikirpudele. Olemasolevaid katsemeetodeid kasutati võimalikus ulatuses (viited 1, 2, 3).

1.2. MÕISTED

Käesoleva metoodika puhul kasutatakse järgmisi mõisteid.

EC₅₀ – kontsentratsioon, mis hinnanguliselt muudab liikumisvõime tuks 50 % vesikirpudest konkreetse kokkupuuteaja vältel. Muu määratluse kasutamisest tuleb teatada ja anda viide.

Liikumisvõime kaotus – neid loomi, kes ei ole võimelised ujuma 15 sekundi jooksul pärast katseanuma ettevaatlikku raputamist, loetakse liikumisvõime kaotanuks (isegi kui nad suudavad liigutada oma tundlaid).

1.3. MEETODI PÕHIMÕTE

Noored vesikirbud vanuses kuni 24 tundi (katse alguseks) viiakse kokkupuutesse uuritava aine eri kontsentratsioonidega 48 tunniks. Liikumisvõime kaotus registreeritakse 24 ja 48 tunni pärast ja seda võrreldakse kontrollkatse väärtustega. Tulemustest arvutatakse EC₅₀ 48 tunni pärast (vt punkt 1.2, määratlus). EC₅₀ kindlaksmääramine pärast 24tunnist kokkupuudet ei ole kohustuslik.

1.4. ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

Tead peaksid olema uuritava aine lahustuvus vees ja aururõhk ning peaks olema usaldusväärne analüütiline meetod, mille abil määrata kindlaks aine kogus uuritavas lahuses ja mille kohta on teada määramise saagis ja määramispiir. Kasulik on teada järgmist: struktuurivalem, aine puhtus, püsivus vees või valguse käes, P_{OW} ja kiire biolagundatavuse katse tulemused (vt meetod C.4).

Märkus: suunised uuritava aine kohta, mille mõju uurimist raskendavad selle füüsikalised-keemilised omadused, on esitatud viites 4.

1.5. VÕRDLUSAINED

EC₅₀ määramist võrdlusaine jaoks võib pidada vahendiks, millega tõendatakse katsetingimuste usaldusväärsust. Selleks soovitatakse kasutada rahvusvahelistes laboritevahelistes võrdluskatsetes kasutatavaid mürkaineid (viited 1, 5) ⁽¹⁾. Katse(d) võrdlusainega tuleb teha eelistatavalt iga kuu, kuid kindlasti vähemalt kaks korda aastas.

⁽¹⁾ Kõnealuste laboritevaheliste katsete tulemuste ja standardi ISO 6341 tehnilise paranduse kohaselt asub kaaliumdikromaadi (K₂Cr₂O₇) 24 tunni EC₅₀ vahemikus 0,6 mg/l kuni 1,7 mg/l.

▼B

1.6. KVALITEEDIKRITERIUMID

Määramise õigsuse tõendamisel kohaldatakse järgmisi kriteeriume:

- kontrollkatsetes, sealhulgas lahuse valmistamisel kasutatud abiaienega kontrollkatsetes, ei tohiks liikumisvõimet kaotada üle 10 % vesikirpudest;
- lahustunud hapniku kontsentratsioon katse lõpus peab kontrollkatse- ja katseanumates olema ≥ 3 mg/l.

Märkus: esimese kriteeriumi puhul ei tohi rohkem kui 10 %-1 vesikirpudest esineda liikumisvõime kaotust või muid haiguse või stressi nähte, näiteks värvuse muutust, ebaharilikku käitumist nagu veepinnale löksu jäämine.

1.7. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.7.1. Seadmed

Katseanumad ja muud seadmed, mis puutuvad kokku katselahustega, peavad täielikult olema valmistatud klaasist või keemiliselt inertsest materjalist. Katseanumateks on tavaliselt klaasist katseklaasid või keeduklaasid, neid tuleb tavaliste laborimeetoditega puhastada enne iga kasutamist. Katseanumad peavad olema vabalt kaetud, et vähendada veekaotust auramise tõttu ja vältida tolmu sattumist lahustesse. Lenduvaid aineid tuleb uurida tihedalt suletud nõudes, mis on piisavalt suured, et hapnikusisaldus ei hakkaks limiteerima ega langeks liiga madalale (vt osa 1.6 ja osa 1.8.3 esimene lõik).

Lisaks kasutatakse veel järgmisi vahendeid: hapnikumõõtja (mikroelektroodi või muu sobiva anduriga, mis võimaldaks mõõta lahustunud hapnikku väikese ruumalaga proovis), pH-meeter, temperatuuri reguleerimiseks vajalik seade, seade orgaanilise süsiniku kogusisalduse (TOC) määramiseks, seade keemilise hapnikutarbe (COD) määramiseks, seade vee kareduse määramiseks jne.

1.7.2. Katsealune organism

Daphnia magna Straus on eelistatud katseliik, kuigi kõnealus katseks võib kasutada ka muid sobivaid *Daphnia* liike (nt *Daphnia pulex*). Katse alguses peavad loomad olema alla 24 tunni vanad ja varieeruvuse vähendamiseks soovitatakse tungivalt, et nad ei oleks esimese haudme järglased. Nad peavad olema terved (st neil ei tohi esineda selliseid stressi tunnuseid nagu suur suremus, isaste ja puhkeolekus munade esinemine, esimese haudme saamise viibimine, loomade värvuse muutus jne). Kõik konkreetsetes katsetes kasutatavad organismid peavad pärinema vesikirpude sama populatsiooni kultuuridest. Populatsiooni loomi tuleb säilitada katsetingimustega sarnanemise kasvatimistingimustes (valgus, temperatuur, keskkond). Kui katsetes kasutatav vesikirpude kasvukeskkond erineb sellest, mida kasutatakse tavalise vesikirpude kultuuri jaoks, on heaks tavaks näha ette katse-eelne aklimatiseerimisperiood. Selleks tuleb haudmevesikirpe hoida lahjendamiseks kasutatavas vees katsetemperatuuril vähemalt 48 tundi enne katse alustamist.

▼B**1.7.3. Hoidmisvesi ja lahjendamiseks kasutatav vesi**

Hoidmisveena ja lahjendamiseks kasutatava veena lubatakse kasutada looduslikku vett (pinna- või põhjavesi), taastatud vett või dekllooritud kraanivett, kui vesikirbud jäävad selles ellu kasvatamise, aklimatiseerimise ja katsetamise ajal ega ilmuta stressi tunnuseid. Katseveeks sobib vesi, mis vastab 1. liites esitatud nõuetekohase lahjendamiseks kasutatava vee keemilistele omadustele. See vesi peab katse vältel olema ühesuguse kvaliteediga. Taastatud vee valmistamiseks lisatakse deioniseeritud või destilleeritud veele täpsed kogused tunnustatud analüütilise puhtusega reaktiive. Viidetes 1 ja 6 ning 2. liites on esitatud taastatud vee näited. Metalle sisaldavate uuritavate ainete puhul tuleks vältida kelaadimoodustajaid sisaldavaid toitesegusid, nagu M4 ja M7 2. liites. pH peaks olema vahemikus 6–9. Karedus peaks *Daphnia Magna* puhul olema vahemikus 140–250 mg/l (CaCO₃-na); teiste *Daphnia* liikide puhul võib sobida väiksem karedus. Lahjendamiseks kasutatavat vett võib enne katset kasutamist aereerida, et lahustunud hapniku kontsentratsioon jõuaks küllastuseni.

Kui kasutatakse looduslikku vett, tuleb selle kvaliteedi parameetreid mõõta vähemalt kaks korda aastas või kui kahtlustatakse, et need omadused võivad olla oluliselt muutunud (vt eelmist lõiku ja 1. liidet). Samuti tuleb mõõta raskmetallide (st Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni) sisaldus. Kui kasutatakse dekllooritud kraanivett, on soovitatav iga päev mõõta kloori sisaldust. Kui lahjendamiseks kasutatakse pinna- või põhjavett, tuleb mõõta juhtivus ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus (TOC) või keemiline hapnikutarve (COD).

1.7.4. Katselahused

Valitud kontsentratsioonidega katselahused saadakse tavaliselt põhilahuse lahjendamisel. Põhilahuse valmistamiseks on soovitatav lahustada aine lahjendamiseks kasutatavas vees. Võimaluse korral tuleb vältida lahustite, emulgaatorite ja dispersantide kasutamist. Siiski võivad nimetatud ühendid olla teatud juhtudel vajalikud piisava kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks. Suunised sobivate lahustite, emulgaatorite ja dispersantide kohta on esitatud viites 4. Igal juhul ei tohi uuritava aine sisaldus katselahustes olla kõrgem kui lahustuvuse piir lahjendamiseks kasutatavas vees.

Katse tuleb teha ilma pH-d muutmata. Kui pH ei püsi vahemikus 6–9, siis võib teha teise katse, milles põhilahuse pH väärtuseks seatakse lahjendamiseks kasutatava vee pH väärtus enne uuritava aine lisamist. pH tuleb korrigeerida nii, et see ei muudaks oluliselt põhilahuse kontsentratsiooni ega põhjustaks uuritava aine keemilist reaktsiooni ega sadenemist. Eelistatakse HCl ja NaOH lahuseid.

▼B

1.8. KATSE KÄIK

1.8.1. **Kokkupuutetingimused**1.8.1.1. *Katserühmad ja kontrollkatsed*

Katseanumasse viiakse vajalik kogus lahjendamiseks kasutatavat vett ja uuritava aine lahust. Öhu ja vee mahu suhe anumates peab olema katse- ja kontrollrühma puhul ühesugune. Seejärel lisatakse anumatesse vesikirbud. Iga uuritava kontsentratsiooni juures ja ka kontrollkatses tuleb kasutada vähemalt 20 looma, eelistatavalt jaotatuna neljaks viieloomaliseks rühmaks. Iga looma kohta peab olema vähemalt 2 ml uuritavat lahust (st viie vesikirbu kohta peab katseanumas olema 10 ml lahust). Katse tegemisel võib kasutada poolstaatilist uuendamist või läbivoolusüsteemi, kui uuritava aine kontsentratsioon ei ole püsiv.

Lisaks uuritavate lahuste seeriatele tuleb kasutada ühte lahjendamiseks kasutatava vee kontrollseeriat ja vajaduse korral ühte kontrollseeriat, mis sisaldab lahuse valmistamisel kasutatud abiainet.

1.8.1.2. *Uuritavad kontsentratsioonid*

Kui uuritava aine toksilisuse kohta ei ole andmeid, võib lõpliku katse kontsentratsioonivahemiku kindlaksmääramiseks teha eelkatse. Selleks viiakse vesikirbud kokkupuutesse lahustega, mis sisaldavad uuritavat ainet suuresti erinevas kontsentratsioonis. Viit vesikirpu hoitakse uuritava aine teatava kontsentratsiooniga lahuses kuni 48 tundi; korduskatseid ei ole vaja. Kokkupuuteaeg võib olla lühem (nt 24 tundi või vähem), kui vahemiku kindlaksmääramiseks vajalikud andmed saadakse kiiremini.

Tuleb kasutada vähemalt viit uuritavat kontsentratsiooni. Need peavad olema geomeetrilises jadas, mille kordaja on eelistatavalt mitte üle 2.2. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleb seda põhjendada. Kõige kõrgema uuritava kontsentratsiooni tulemuseks peaks eelistatavalt olema 100 %line liikumisvõime kaotus ja kõige madalamal uuritaval kontsentratsioonil ei peaks eelistatavalt olema jälgitavat toimet.

1.8.1.3. *Inkubatsioonitingimused*

Temperatuur peab olema vahemikus 18–22 °C ja iga üksiku katse puhul peaks see olema konstantne piirides ± 1 °C. Soovitav on 16tunnise valguse ja kaheksatunnise pimeduse tsükkel. Lubatud on ka täielik pimedus, eriti testitavate ainete puhul, mis on valguse käes ebastabiilsed.

Katseanumaid ei tohi katse ajal aereerida. Katse tehakse ilma pH-d muutmata. Vesikirpe ei tohi katse ajal toita.

1.8.1.4. *Kestus*

Katse kestus on 48 tundi.

1.8.2. **Vaatlused**

Igas katseanumas tuleb 24 ja 48 tundi pärast katse algust määrata liikumisvõime kaotanud vesikirpude arv (vt punkt 1.2 „Mõisted”). Lisaks liikumisvõime kaotusele tuleb registreerida kõik normist kõrvalekaldumised käitumises või välimuses.

▼B**1.8.3. Analüütilised mõõtmised**

Katse alguses ja lõpus mõõdetakse kontrollkatse(te)s ja kõige kõrgema uuritava aine kontsentratsiooniga lahuses lahustunud hapniku sisaldus ja pH. Lahustunud hapniku sisaldus kontrollkatsetes peab vastama määramise õigsuse kriteeriumile (vt punkt 1.6). pH ei tohiks tavaliselt muutuda üle 1,5 ühiku üheski katses. Temperatuuri mõõdetakse tavaliselt kontrollkatse anumates või ümbritsevas õhus ja see tuleb kirja panna eelistatavalt pidevalt katse käigus või äärmisel juhul vähemalt katse alguses ja lõpus.

Uuritava aine kontsentratsioon tuleb mõõta vähemalt kõige kõrgemal ja madalamal kontsentratsioonil katse alguses ja lõpus (viide 4). Tulemused peaksid soovitatavalt põhinema mõõdetud kontsentratsioonidel. Ent kui saab tõendada, et uuritava aine kontsentratsioon on katse jooksul rahuldavalt säilinud $\pm 20\%$ juures nominaalsest või mõõdetud algkontsentratsioonist, võivad katse tulemused põhineda nominaalsetel või mõõdetud algväärtustel.

1.9. PIIRSISALDUSKATSE

Käesolevat meetodit kasutades võib teha piirsalduskatse uuritava aine kontsentratsioonil 100 mg/l või katsekeskkonnas lahustuvuse piiril (olenevalt sellest, kumb neist on madalam) ja tõendada nii, et EC_{50} on kõrgem kui see kontsentratsioon. Piirsalduskatse tegemisel tuleb kasutada 20 vesikirpu (eelistatavalt jaotatuna neljaks viieloomaliseks rühmaks) ja panna sama arv loomi ka kontrollkatse(te)sse. Kui kas või osagi vesikirpudest kaotab liikumisvõime, tuleb sooritada täielik uuring. Iga kõrvalekalle normaalsest käitumisest tuleb registreerida.

2. ANDMED

Andmed tuleb esitada kokkuvõtvas tabelis, näidates iga katse- ja kontrollrühma jaoks kasutatud vesikirpude arvu ja liikumisvõime kaotuse igal vaatlemisel. Koostatakse graafik 24 ja 48 tundi pärast liikumisvõime kaotanud vesikirpude protsendi sõltuvuse kohta uuritava aine kontsentratsiooni. Andmeid analüüsitakse sobivate statistiliste meetoditega (nt probit-analüüs jne), et arvutada kõverate tõusud ja EC_{50} 95 %lised usalduspiirid ($p = 0,05$) (7, 8).

Kui saadud andmete puhul ei saa EC_{50} arvutamise standardmeetodeid rakendada, tuleb EC_{50} umbkaudseks määramiseks kasutada kõige kõrgemat kontsentratsiooni, mis ei põhjusta liikumisvõime kaotust, ja kõige madalamat kontsentratsiooni, mis põhjustab liikumisvõime kaotuse 100 % (selleks peetakse nende kahe kontsentratsiooni geomeetrilist keskmist).

3. TULEMUSTE VORMISTAMINE**3.1. KATSEARUANNE**

Katsearuandes esitatakse järgmine teave.

Uuritav aine:

— füüsikaline laad ja olulised füüsikalis-keemilised omadused;

▼B

— andmed keemiliseks identifitseerimiseks, sealhulgas puhtus.

Katseorganismi liik:

— *Daphnia* päritolu ja liik, algne tarnija (kui on teada) ja kasutatud kultuuri tingimused (kaasa arvatud toidu päritolu, tüüp ja kogus, toitmise sagedus).

Katsetingimused:

— katseanumate kirjeldus: anumate tüüp, lahuse kogus, vesikirpude arv katseanuma kohta, katseanumate (korduskatsete) arv kontsentratsiooni kohta;

— põhi- ja katselahuste valmistamise meetodid, kaasa arvatud mis tahes lahustite või dispersantide kasutamine, kasutatud kontsentratsioonid;

— üksikasjad lahendamiseks kasutatava vee kohta: vee päritolu ja kvaliteediomadused (pH, karedus, Ca/Mg suhe, Na/K suhe, aluselisis, juhtivus jne); taastatud vee koostis, kui seda kasutati;

— inkubatsioonitingimused: temperatuur, valguse intensiivsus ja valgustamise perioodid, lahustunud hapnik, pH jne.

Tulemused:

— kontrollkatsetes ja igas katserühmas mis tahes vaatlusajal liikumisvõime kaotanud või kõrvalekaldeid (kaasa arvatud ebanormaalne käitumine) ilmutanud vesikirpude arv ja protsent ning ilmnenu nähtuste kirjeldus;

— võimaluse korral võrdlusainega tehtud katse tulemused ja kuupäev;

— nominaalsed uuritavad kontsentratsioonid ja kõik tulemused, mis saadi uuritava aine kontsentratsiooni määramisel katseanumas; samuti tuleb teatada määramismeetodi saagis ja määramispiir;

— kõigi katse ajal tehtud füüsikalise-keemiliste mõõtmiste tulemused: temperatuuri, pH ja lahustunud hapniku väärtused;

— EC₅₀ 48 tunni pärast koos usaldusintervallidega ja graafik sobitatud mudeli kohta, millest need arvutati, annuse ja toime kõverate tõusud ja nende standardviga; EC₅₀ kindlaksmääramiseks kasutatud statistiline meetod (kui määrati ka liikumisvõime kadu 24 tunni pärast, tuleb esitada ka need andmed);

— selgitused iga kõrvalekalde kohta katse tegemise eeskirjast ja arutelu, kui võrd see võis mõjutada katse tulemusi.

4.

VIITED

- 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 LC₅₀. In Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation (edited by F.I. Mayer and J.L. 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*1. liide***LAHJENDAMISEKS KASUTATAVA VEE NÕUTAVAD KEEMILISED
OMADUSED**

Aine	Kontsentratsioon
tahked osakesed	< 20 mg/l
orgaanilise süsiniku kogusisaldus	< 2 mg/l
ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
jääkkloor	< 10 µg/l
fosfororgaaniliste pestitsiidide kogusisaldus	< 50 ng/l
kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide kogusisaldus	< 50 ng/l
orgaanilise kloori kogusisaldus	< 25 ng/l



2. liide

SOBIVA TAASTATUD KATSEVEE NÄITED

SO katsevesi (1)

Põhilahused (üks aine)		Taastatud vee valmistamiseks lisada järgmised põhilahuste kogused 1 liitrile veele (*)
Aine	1 liitrile veele lisatav kogus (*)	
kaltsiumkloriid CaCl ₂ , 2H ₂ O	11,76 g	25 ml
magneesiumsulfaat MgSO ₄ , 7H ₂ O	4,93 g	25 ml
naatriumvesinikkarbonaat NaHCO ₃	2,59 g	25 ml
kaaliumkloriid KCl	0,23 g	25 ml

(*) Sobiva puhtusastmega vesi, st puhastatud ionvahetuse, destilleerimise või pöördosmoosiga; vee juhtivus ei ületa eelistatavalt 10 µS/cm⁻¹.

Elendti keskkonnad M7 ja M4

Aklimatiseerimine Elendti keskkondadega M4 ja M7

Mõnes laboris on olnud raskusi vesikirbu otsesel üleviimisel keskkondadesse M4 ja M7. Teatavat edu on siiski saavutatud järkjärgulise aklimatiseerimisega, st viimisega oma keskkonnast 30 %lisse, siis 60 %lisse ja seejärel 100 %lisse Elendti keskkonda. Aklimatiseerimisperioodid võivad olla kuu aja pikkused.

Valmistamine

Mikroelemendid

Individuaalsete mikroelementide põhilahused (I) valmistatakse esmalt sobiva puhtusega vees, st deioniseeritud, destilleeritud või pöördosmoosiga puhastatud vees. Nendest põhilahustest (I) valmistatakse järgmine üks põhilahus (II), mis sisaldab kõiki mikroelemente (kombineeritud lahus), st:

I põhilahus(ed) (üks aine)	Veele lisatav kogus (mg/l)	Kontsentratsioon (keskkond M4-ga võrreldes)	Kombineeritud II põhilahuse valmistamiseks lisada veele järgmine kogus I põhilahust (ml/l)	
			M4	M7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000kordne	1,0	0,25
MnCl ₂ -4H ₂ O	7 210	20 000kordne	1,0	0,25
LiCl	6 120	20 000kordne	1,0	0,25

▼B

I põhilahus(ed) (üks aine)	Veele lisatav kogus (mg/l)	Kontsentratsioon (kesk-kond M4-ga võrreldes)	Kombineeritud II põhilahuse valmistamiseks lisada veele järgmine kogus I põhilahust (ml/l)	
			M4	M7
RbCl	1 420	20 000kordne	1,0	0,25
SrCl ₂ -6H ₂ O	3 040	20 000kordne	1,0	0,25
NaBr	320	20 000kordne	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1 230	20 000kordne	1,0	0,25
CuCl ₂ ·2H ₂ O	335	20 000kordne	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000kordne	1,0	1,0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200	20 000kordne	1,0	1,0
KI	65	20 000kordne	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000kordne	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000kordne	1,0	1,0
Na ₂ EDTA-2H ₂ O	5 000	2 000kordne	—	—
FeSO ₄ ·7H ₂ O	1 991	2 000kordne	—	—

Na₂EDTA ja FeSO₄ lahused valmistatakse eraldi, valatakse kokku autoklaavitakse kohe

Nii saadakse:

2 l Fe-EDTA lahust		1 000kordne	20,0	5,0
--------------------	--	-------------	------	-----

Keskkonnad M4 ja M7

Keskkondade M4 ja M7 valmistamiseks kasutatakse II põhilahust, makrotoitaineid ja vitamiine järgmiselt:

	Veele lisatav kogus (mg/l)	Kontsentratsioon (kesk-kond M4-ga võrreldes)	Keskkonnale lisatav II põhilahuse kogus (ml/l)	
			M4	M7
II põhilahus (kombineeritud mikroelemendid)		20kordne	50	50
Makrotoitainete põhilahused (üks aine)				
CaCl ₂ – 2H ₂ O	293 800	1 000kordne	1,0	1,0
MgSO ₄ – 7H ₂ O	246 600	2 000kordne	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000kordne	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000kordne	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ – 9H ₂ O	50 000	5 000kordne	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000kordne	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000kordne	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000kordne	0,1	0,1

▼B

	Veele lisatav kogus (mg/l)	Kontsentratsioon (keskkond M4-ga võrreldes)	Keskkonnale lisatav II põhilahuse kogus (ml/l)	
			M4	M7
Kombineeritud vitamiinide põhilahus	—	10 000kordne	0,1	0,1
Kombineeritud vitamiinide põhilahuse valmistamiseks lisatakse 3 vitamiini 1 liitrile veele järgmistes kogustes:				
tiamiinvesinikkloriid	750	10 000kordne		
tsüanokobalamiin (B ₁₂)	10	10 000kordne		
biotiin	7,5	10 000kordne		

Kombineeritud vitamiinide põhilahust säilitatakse külmutatult väikeste alikvootidena. Vitamiinid lisatakse keskkonnale vahetult enne kasutamist.

NB: Soolade sadenemise vältimiseks lisatakse täieliku keskkonna valmistamisel põhilahuste alikvoodid umbes 500–800 ml deioniseeritud veele ja seejärel täiendatakse veega kuni 1 liitrini.

NB: Keskkonna M4 koostis avaldati esimest korda järgmises artiklis: Elendt, B. P. (1990). Selenium deficiency in Crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, 25-33.

▼ **M1****C.3. MAGEVEEVETIKATE JA TSÜANOBAKTERITE KASVU
PIDURDAMISE KATSE****1. METOODIKA**

Käesolev metoodika on samaväärne standardiga OECD TG 201 (2006) (1).

1.1. SISSEJUHATUS

Metoodikaid on vaja teaduse arengut arvestades korrapäraselt läbi vaadata ja ajakohastada. Metoodika C.3 vajas läbivaatamist, et lisada täiendavaid liike ja viia see vastavusse ohu hindamise nõuetega ning kemikaalide klassifikatsiooniga. Läbivaatamisel võeti aluseks laialdased praktilised kogemused, teaduse edusammud vetikatele toksiliste ainete uurimisel ja asjaomaste õigusaktide laialdane rakendamine pärast esialgse metoodika kasutuselevõttu.

1.2. MÕISTED

Käesoleva metoodikaga seoses kasutatakse järgmisi mõisteid ja lühendeid.

Biomass on populatsiooni elusaine kuivmass teatava mahuühiku kohta, nt vetikate kuivmass milligrammides ühe liitri katselahuse kohta. Tavaliselt tähendab „biomass” lihtsalt massi, kuid käesoleva metoodika tähenduses on see mass mahuühiku kohta. Käesoleva meetodi kasutamisel mõõdetakse harilikult biomassi asendavaid näitajaid, nagu rakkude arv, fluorestsents jne; sellisel juhul mõistetakse termini „biomass” all ka kõnesolevaid asendusnäitajaid.

Variatsioonikordaja on suhteline (mõõtühikuta) näitaja, mis iseloomustab parameetri varieeruvust ja võrdub standardhälbe ja keskvaartuse suhtega. Seda võib väljendada ka protsentides. Paralleelsete kontrollkultuuride kasvu keskmise erikiiruse keskmine variatsioonikordaja arvutatakse järgmiselt:

1. ööpäevade ja/või lõikude kaupa leitud kasvukiiruste põhjal arvutatakse asjaomase paralleelkultuuri kasvu keskmise erikiiruse variatsioonikordaja protsentides;
2. paralleelsete kontrollkultuuride ööpäevade/lõikude kaupa mõõdetud kasvu keskmise erikiiruse keskmine variatsioonikordaja leidmiseks arvutatakse 1. punkti kohaselt leitud väärtuste keskmine.

EC_x on katsekeskkonnas lahustatud uuritava aine kontsentratsioon, mille puhul katseorganismi kasv pidurdub x % (nt 50 %) võrra, kui see organism puutub ainega kokku kindlaksmääratud ajavahemiku jooksul (kui kokkupuuteaeg erineb täielikust ehk tavaliselt katsetes kasutatavast kokkupuuteajast, tuleb selle pikkus täpselt märkida). Kasvukiiruse järgi ja saagise järgi leitavate EC väärtuste eristamiseks kasutatakse vastavalt tähiseid E_pC ja E_yC .

Sööde on täielik sünteetiline keskkond, milles katsetetikaid kasvatakse uuritava ainega kokkupuutumise ajal. Tavaliselt lahustatakse uuritav aine katsekeskkonnas.

Kasvukiirus (keskmine kasvu erikiirus) on biomassi logaritmilise suurenemine kokkupuute ajal.

▼ **M1**

Madalaim avastatava mõjuga kontsentratsioon on madalaim uuritud kontsentratsioon, mille puhul on näidatud, et teatava kokkupuuteaja jooksul pidurdab uuritav aine kontrolliga võrreldes statistiliselt oluliselt ($p < 0,05$) katseorganismi kasvu. Kõik madalaimast avastatava mõjuga kontsentratsioonist kõrgemad kontsentratsioonid peavad avaldama sama tugevat või tugevamat kahjulikku mõju kui madalaim avastatava mõjuga kontsentratsioon. Kui neid kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleb anda täielik selgitus, kuidas valiti madalaim avastatava mõjuga kontsentratsioon (ja avastatava mõjuga kontsentratsioon).

Avastatava mõjuga kontsentratsioon on madalaimast avastatava mõjuga kontsentratsioonist allapoole järgmine uuritud kontsentratsioon.

Kostemuutuja on toksilisuse hindamiseks kasutatav muutuja, mis tuletatakse biomassi kajastavast mõõtemuutujast mitmesuguste arvutuste abil. Käesoleva meetoodika tähenduses on kostemuutujateks kasvukiirus ja saagis, mis tuletatakse biomassi otsese mõõtmise andmetest või eespool mainitud asendusnäitajate mõõtmisest.

Kasvu erikiirus on kostemuutuja, mis määratletakse jagatisena, mille lugejaks on uuritava parameetri (käesoleva meetoodika puhul biomassi) väärtuste naturaallogaritmide vahe ja nimetajaks asjaomane ajavahemik.

Saagis on kokkupuuteaja lõpus ja alguses leitud mõõdetava muutuja väärtuste vahe, mis väljendab katse jooksul toimunud biomassi kasvu.

1.3. MEETODI RAKENDATAVUS

Käesolevat meetodit on kõige lihtsam rakendada vees lahustuvate ainete puhul, mis katsetingimustes tõenäoliselt püsivad vesilahuses. Kui uuritav aine on lenduv, seostub tugevasti pindadega, on värviline või vees vähelahustuv või võib mõjutada söötme toit- või mineraalainete kättesaadavust, siis võib kirjeldatud määramismeetodis olla vaja teha teatavaid muudatusi (nt kasutada suletud süsteemi, valmistada katsenõusid eelnevalt spetsiaalselt ette). Juhendid teatavate vajalike muudatuste tegemiseks on esitatud standardites (2, 3, 4).

1.4. KATSE PÕHIMÕTE

Katse eesmärk on määrata uuritava aine mõju magevee-mikrovetikate ja/või tsüanobakterite kasvule. Portskultuuris lastakse eksponentsiaalse kasvu faasis olevatel katseorganismidel uuritava ainega kokku puutuda tavaliselt 72 tunni jooksul. Vaatamata suhteliselt lühikesele katseajale võimaldab see hinnata, millist mõju avaldab uuritava ainega kokkupuutumine mitme põlvkonna vältel.

Katsesüsteemi koste on vetikakultuuri seeriade (katseüksused) kasvu pidurdumine kokkupuutumisel uuritava aine mitmesuguste kontsentratsioonidega. Katsesüsteemi koste hindamiseks uuritakse kasvu sõltuvust aine kontsentratsioonist ja võrreldakse seda keskmise kasvuga paralleelsetes kontrollkultuurides, kuhu uuritavat ainet ei ole lisatud. Et süsteemi koste toksilisele mõjule täielikult avalduks (optimaalne tundlikkus), lastakse kultuuridel küllaldase aja jooksul piiramatult eksponentsiaalselt kasvada piisava toitainete sisalduse ja pideva valguse tingimustes, et mõõta kasvu erikiiruse vähenemist.

▼ **M1**

Kasvu ja kasvu pidurdamise kvantitatiivseks iseloomustamiseks mõõdetakse vetikate biomassi sõltuvust ajast. Vetikate biomass on määratletud kuivmassina ruumala kohta, nt milligrammides ühe liitri katselahuse kohta. Kuna kuivmassi on raske mõõta, kasutatakse asendusparameetreid. Asendusparameetritest kasutatakse kõige rohkem rakkude arvu. Asendusparameetriteks võivad olla veel rakkude maht, fluorestsents, optiline tihedus jne. On vaja teada kordajat, mille abil saab mõõdetava asendusparameetri arvutada ümber biomassiks.

Katsetulem on kasvu pidurdumine, kusjuures kasvu väljendatakse biomassi logaritmi suurenemisena kokkupuuteaja jooksul (keskmine kasvu erikiirus). Katselahuste seerias määratud keskmistest kasvu erikiirustest leitakse kontsentratsioon, mis vähendab kasvukiirust teatava protsendimäära x võrra (näiteks 50 %); selle kontsentratsiooni tähis on $E_r C_x$ (nt $E_r C_{50}$).

Kui käesolevat meetodit rakendatakse ELi õigusraamistikus, peaksid tulemuste arvutused punktis 2.2 kirjeldatud põhjusi arvestades põhinema kasvu keskmisel erikiirusel. Lisaks kasutatakse käesoleva meetodi korral kostemuutujana veel saagist, mida võib vaja olla teatavates riikides kehtestatud erieeskirjade täitmiseks. Saagis on määratletud kokkupuuteaja lõpus ja alguses olevate biomasside vahena. Katselahuste seerias määratud saagiste põhjal leitakse kontsentratsioon, mis vähendab saagist teatava protsendimäära x võrra (näiteks 50 %); selle tähis on $E_y C_x$ (nt $E_y C_{50}$).

Lisaks sellele võib statistiliselt määrata madalaima avastatava mõjuga kontsentratsiooni ja ka avastatava mõjuta kontsentratsiooni.

1.5. ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

Katsetingimuste kindlaksmääramiseks võib uuritava aine kohta olla vaja teada järgmisi andmeid: struktuurivalem, puhtusaste, püsivus valguse käes, püsivus katsetingimustes, valguse neeldumisega seotud omadused, pK_a ja andmed aine muundumiste kohta, sealhulgas biolagunduvus vees.

On vaja teada uuritava aine lahustuvust vees, jaotuskoeffitsienti oktaanooli-vee süsteemis (P_{ow}) ja aururõhku; katselahuses oleva aine kontsentratsiooni mõõtmiseks peaks olema valideeritud meetod, mille kohta oleksid teada tulemuslikkus ja määramispiir.

1.6. STANDARDINE

Katse teostuse kontrollimiseks võib kasutada rahvusvahelistes võrdluskatsetes (4) kasutatavaid standardaineid, näiteks 3,5-diklorofenooli. Rohevetikate puhul võib standardainena kasutada ka kaaliumdikromaati. Kontrolli standardainega soovitatakse teha vähemalt kaks korda aastas.

1.7. KATSE VASTAVUS NÕUETELE

Katse on läbi viidud nõuetekohaselt, kui on täidetud järgmised kriteeriumid.

▼ **M1**

- Kontrollkultuuri biomass peab 72-tunnise katseaja jooksul olema eksponentsiaalselt suurenenud vähemalt 16 korda. See vastab kasvu erikiirusele $0,92 \text{ ööpäev}^{-1}$. Kõige sagedamini kasutatavate liikide puhul on kasvukiirus tavaliselt palju suurem (vt 1. liide). See kriteerium ei pea olema täidetud, kui kasutatakse 1. liites loetletud liikidest aeglasemalt kasvavaid liike. Sellisel juhul tuleb katseaega pikendada, nii et kontrollkultuuri biomass kasvaks vähemalt 16-kordseks, kusjuures kasv peab kogu katse ajal olema eksponentsiaalne. Kui piiramatult eksponentsiaalse kasvu tingimustes saavutatakse biomassi nõutav 16-kordne kasv lühema ajaga, võib katseaega lühendada 48 tunnini.
- Lõikude kaupa (72-tunnise katse puhul katsepäevad 0–1, 1–2 ja 2–3) leitud kontrollkultuuride kasvu erikiiruste keskmine variatsioonikordaja (vt punkt 1.2, variatsioonikordaja) ei tohi ületada 35 %. Kontrollkultuuride kasvu erikiiruste lõikude kaupa arvutamise kohta vt punkt 2.2.1, teine lõik. Seda kriteeriumi rakendatakse paralleelsete kontrollkultuuride puhul arvatud variatsioonikordaja keskmise väärtuse suhtes.
- Katsetes *Pseudokirchneriella subcapitata* ja *Desmodesmus subspicatus*’ega ei tohi paralleelsete kontrollkultuuride keskmiste kasvu erikiiruste variatsioonikordaja kogu katseaja jooksul ületada 7 %. Harvemini kasutatavate liikide korral ei tohi see väärtus ületada 10 %.

1.8. MEETODI KIRJELDUS

1.8.1. Seadmed

Katselahusega kokku puutuvad katsenõud ja muud seadmed peavad olema tervenisti klaasist või muust keemiliselt inertest materjalist. Seadmed peavad olema hoolikalt pestud, et orgaanilised või anorgaanilised lisandid ei mõjutaks vetikate kasvu või katselahuse koostist.

Katse viiakse tavaliselt läbi klaaskolvis, mis on piisavalt suur, et katse ajal saaks mõõtmisteks võtta küllaldases mahus kultuuri, ja oleks tagatud piisav CO_2 massiülekanne atmosfäärist (vt punkt 1.8.9, teine lõik). Tuleb silmas pidada, et vedeliku maht oleks küllaldane analüüside tegemiseks (vt punkt 1.8.11, viies lõik).

Lisaks sellele võib vaja minna järgmisi seadmeid.

- Kultiveerimisvõre: soovitatav on kasutada kappi või kambrit, milles inkubatsioonitemperatuuri hoitakse täpsusega $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

- Fotomeetrid: on oluline silmas pidada, et valgustatuse mõõtmise meetod ja eriti vastuvõtja (kollektori) tüüp mõjutavad mõõdetavat väärtust. Mõõtmiseks kasutatakse eelistatavalt sfäärilist (4π) vastuvõtjat (reageerib igast suunast, nii ülalt- kui ka altpoolt mõõdetasapinda saabuval otsesele ja peegeldunud valgusele) või poolsfäärilist (2π) vastuvõtjat (reageerib igast suunast ülalt-poolt mõõdetasapinda saabuval valgusele).

▼ **M1**

— Seade vetikate biomassi määramiseks. Rakkude arvu, mis on kõige sagedamini kasutatav vetikate biomassi asendusparameeter, võib määrata elektroonilise osakesteloeenduri, loenduskaamriga varustatud mikroskoobi või läbivoolutsütomeetri abil. Muid biomassi asendusparameetreid võib mõõta läbivoolutsütomeetri, fluorimeetri, spektrofotomeetri või kolorimeetri abil. On kasulik arvutada ümberarvutustegur üleminekuks rakkude arvult kuivmassile. Kui madalatel biomassi kontsentratsioonidel kasutatakse spektrofotomeetrit, võib kasutuskõlblike mõõtmistulemuste saamiseks olla vaja küvette, mille optilise tee pikkus on vähemalt 4 cm.

1.8.2. **Katseorganismid**

Võib kasutada mitmeid vabalt ujuvate mikrovetikate ja tsüanobakterite liike. On näidatud, et käesolevas metoodikas esitatud määramismeetodi korral sobivad kasutamiseks 1. liites loetletud tüved.

Kui kasutatakse muid liike, tuleb märkida kasutatud tüvi ja/või selle päritolu. Tuleb tõendada, et valitud katsevetikate kasv on kasutatavates tingimustes kogu katseaja kestel eksponentsiaalne.

1.8.3. **Sööde**

Soovitatakse kasutada kas OECD või AAP söödet. Nende söötmete koostis on esitatud 2. liites. Tuleb silmas pidada, et nende söötmete pH algväärtused ja puhvermahtuvused (viimane kompenseerib pH tõusu) on erinevad. Seetõttu võivad katse tulemused sõltuda kasutatud söötmest, eriti kui uuritakse ioniseeruva aine mõju.

Teatavatel juhtudel, näiteks metallide ja kelaaditekitajate uurimise korral või katsetel erineva pH väärtuse juures, võib olla vaja söödet muuta. Muudetud söötme kasutamist tuleb üksikasjalikult kirjeldada ja põhjendada (3, 4).

1.8.4. **Biomassi algkontsentratsioon**

Biomassi algkontsentratsioon peab kõigis uuritava ainega kultuurides olema sama ja piisavalt madal, et kasv püsiks kogu inkubatsiooniaja kestel eksponentsiaalne ja ei tekiks toitainete ammendumise ohtu. Biomassi kuivaine algkontsentratsioon ei tohi olla kõrgem kui 0,5 mg/l. Soovitatakse kasutada järgmisi rakkude algkontsentratsioone:

<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	5×10^3 – 10^4	rakku/ml
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	2 – 5×10^3	rakku/ml
<i>Navicula pelliculosa</i>	10^4	rakku/ml
<i>Anabaena flos-aquae</i>	10^4	rakku/ml
<i>Synechococcus leopoliensis</i>	5×10^4 – 10^5	rakku/ml

1.8.5. **Uuritava aine kontsentratsioon**

Kontsentratsioonivahemiku, milles mõju tõenäoliselt avaldub, võib määrata mõjuvahemiku hindamise katsete tulemuste alusel. Lõpliku katse tegemisel kasutatakse vähemalt viit geomeetrilise jadana järjestatud kontsentratsiooni, kus jadategur ei ole suurem kui 3,2. Laugema kontsentratsiooni-mõju kõvera korral võib olla õigustatud suurema jadateguri kasutamine. Eelistatavalt peaks kontsentratsioonide jada hõlmama vahemiku, milles vetikate kasvukiirus pidurdub 5–75 % võrra.

▼ **M1****1.8.6. Paralleel- ja kontrollkultuurid**

Katseplaanis tuleb ette näha kolm paralleelkultuuri iga uuritava kontsentratsiooni kohta. Kui avastatava mõjuta kontsentratsiooni määramist ei nõuta, võib katseplaani muuta selliselt, et suurendatakse uuritavate kontsentratsioonide arvu ja vähendatakse paralleelkultuuride arvu ühe kontsentratsiooni kohta. Paralleelseid kontrollkultuure peab olema vähemalt kolm ja parimal juhul võiks neid olla kaks korda rohkem kui iga uuritava kontsentratsiooni puhul kasutatavaid paralleelkultuure.

Uuritava aine kontsentratsioonide määramiseks võib valmistada eraldi katselahuste seeria (vt punkt 1.8.11, neljas ja kuues lõik).

Kui uuritava aine lahustamiseks kasutatakse lahustit, tuleb katseplaanis ette näha täiendavad kontrollkultuurid, millele on lisatud lahustit samas kontsentratsioonis kui uuritava ainega kultuuridele.

1.8.7. Inokulum-kultuuri valmistamine

Harjutamiseks katsetetikaid katsetingimustega ja tagamaks, et katselahuse inokuleerimisel on vetikad eksponentsiaalse kasvu faasis, valmistatakse katsekeskkonnas 2–4 päeva enne katse algust inokulum-kultuur. Vetikate biomass reguleeritakse nii, et inokulum-kultuuris oleks enne katse algust ülekaalus eksponentsiaalne kasv. Inokulum-kultuuri inkubeeritakse samades tingimustes kui uuritava ainega kultuure. Veendumaks, et katsetüvi kasvab kultiveerimistingimustes normaalselt, mõõdetakse inokulum-kultuuris biomassi juurdekasvu. 3. liites on esitatud ühe vetikate kultiveerimise katse näide. Rakkude sünkroonse pooldumise vältimiseks katse ajal võib olla vajalik inokulum-kultuuri teistkordne ülekandmise etapp.

1.8.8. Katselahuste valmistamine

Kõigis katselahustes peab söötme kontsentratsioon ja katsetetikate biomassi algkontsentratsioon olema ühesugune. Valitud kontsentratsiooniga katselahuste valmistamiseks segatakse tavaliselt uuritava aine põhilahus söötme ja inokulum-kultuuriga. Põhilahuse saamiseks lahustatakse uuritav aine tavaliselt söötmes.

Vees raskesti lahustuvate ainete lisamiseks söötmele võib kasutada lahusteid, näiteks atsetooni, *t*-butüülalkoholi või dimetüülformamiidi (2, 3). Lahusti kontsentratsioon ei tohi olla kõrgem kui 100 µl/l ja peab olema sama kõigis katseseeria kultuurides, kaasa arvatud kontrollkultuurid.

1.8.9. Inkubeerimine

Katsenõud suletakse õhku läbi laskvate korkidega. Nõusid loksutatakse ja need asetatakse kultiveerimisseadmesse. Katse ajal on vetikaid vaja hoida suspensioonis ja soodustada CO₂ transporti. Selleks loksutatakse või segatakse kultuure pidevalt. Kultuure termostateeritakse temperatuurivahemikus 21–24 °C täpsusega ± 2 °C. Kui kasutatakse 1. liites loetlemata liike (nt troopilised liigid), võib olla vaja valida kõrgem temperatuur, kuid nõuetele vastavuse kriteeriumid peavad olema täidetud. On soovitatav paigutada kolvid inkubaatoris juhuslikult ja muuta iga päev nende paigutust.

▼ **M1**

Katse ajal ei tohi kontrollkeskkonna pH tõusta enam kui 1,5 ühiku võrra. Kui uuritakse metalle või ühendeid, mis katsekeskkonna pH väärtustel on osaliselt ioniseeritud, võib reprodutseeritavate ja selgete tulemuste saamiseks olla vaja piirata pH muutumist. Tehniliselt on võimalik saavutada, et pH muutuks vähem kui 0,5 ühikut, kui tagada, näiteks loksutamiskiiruse suurendamisega, piisavalt kiire CO₂ ülekanne atmosfääriõhust katselahusesse. Teine võimalus on vähendada CO₂ tarvet, vähendades algset biomassi või katse kestust.

Pinnale, millel inkubeeritakse kultuure, suunatakse pidev ühtlane külmvalge või päevavalgusspektriga fluorestsentsvalgus. Vetikate ja tsüanobakterite tüvede valgusetarve on erinev. Valguse intensiivsus valitakse vastavalt kasutatava katseorganismi vajadusele. Soovitatud rohevetikaliikide puhul valitakse valguse intensiivsuseks katselahuste tasapinnal 60–120 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, mõõdetuna sobiva anduri abil fotosünteesiks sobivas lainepikkuse vahemikus 400–700 nm. Mõni liik, eriti *Anabaena flos-aquae*, kasvab hästi nõrgema valguse juures ja liigne valgus võib teda kahjustada. Sellise liigi puhul valitakse keskmiseks valguse intensiivsuseks 40–60 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. (Luksides kalibreeritud fotomeetri puhul vastab külmvalge valguse soovitatud valgustatuse vahemikule 60–120 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ vahemik 4 440 – 8 880 luksit). Valguse intensiivsus inkubatsiooniala eri osades ei tohi keskmisest väärtusest erineda üle 15 %.

1.8.10. **Katse kestus**

Katse kestab harilikult 72 tundi. Võib siiski kasutada ka lühema või pikema kestusega katseid tingimusel, et kõiki nõuetele vastavuse kriteeriume (vt punkt 1.7) on võimalik täita.

1.8.11. **Mõõtmised ja analüütilised määramised**

Katse ajal määratakse vetikate biomassi igas kolvis vähemalt üks kord ööpäevas. Kui mõõtmiseks kasutatakse katselahusest pipetiga võetud väikesi proove, ei panda neid enam katselahusesse tagasi.

Biomassi mõõdetakse kas mikroskoobi abil rakkude silmaga loendamise või elektroonilise osakeste loenduriga (määratakse rakkude arv ja/või biomaht). Võib kasutada ka alternatiivmeetodeid, nt läbi-voolutsütomeetriat, klorofüllü fluorestsentsi *in vitro* või *in vivo* (6, 7) või optilist tihedust, kui saab näidata, et katses esinevas biomassi vahemikus on asjaomaste parameetrite ja biomassi vahel rahuldav korrelatsioon.

Lahuste pH mõõdetakse katse alguses ja lõpus.

Kui uuritavat ainet on kasutatavas kontsentratsioonivahemikus võimalik määrata, siis kontrollitakse aine algkontsentratsiooni katselahuses ja kontsentratsiooni püsivust katse ajal.

▼ **M1**

Kui kontsentratsiooni muutus katse ajal on tõenäoliselt alla 20 % nominaalväärtusest, siis piisab uuritava aine kontsentratsiooni määramisest katse alguses ja lõpus ühel madalal ja ühel kõrgel väärtusel ja eeldatava EC₅₀ läheduses. Kui kontsentratsioon tõenäoliselt ei püsi vahemikus 80–120 % nominaalväärtusest, siis soovitatakse kõigi uuritavate kontsentratsioonide määramist katse alguses ja lõpus. Kui uuritav aine on lenduv, ebapüsiv või adsorbeerub pindadele, soovitatakse katse ajal võtta iga 24 tunni tagant määramiseks lisaproove, et paremini jälgida uuritava aine kadu. Selliste ainete puhul on vaja täiendavaid paralleelkultuure. Igal juhul on uuritava aine kontsentratsioon igal uuritaval väärtusel vaja määrata ainult ühes paralleelkultuuri nõus (või ühes paralleelkultuuridest kokku segatud proovis).

Söötmeid, mis valmistatakse spetsiaalselt kokkupuutekontsentratsiooni määramiseks, käideldakse täpselt samuti kui katse kasutatavaid söötmeid, st need inokuleeritakse vetikatega ja neid inkubeeritakse samades tingimustes. Uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks lahuses võib olla vaja vetikate eraldamist kasvukeskkonnast. Eraldamiseks kasutatakse eelistatavalt tsentrifuugimist madalal, kuid vetikate sadestamiseks piisaval kiirendusel.

Kui saab tõendada, et uuritava aine kontsentratsioon püsib katse ajal nominaalse või mõõdetud algväärtuse läheduses täpsusega $\pm 20\%$, võib tulemuste analüüsil kasutada nominaalset või mõõdetud algväärtust. Kui kõrvalekalle nominaalsest või mõõdetud algväärtusest on suurem kui $\pm 20\%$, kasutatakse tulemuste analüüsil katse geomeetrilist keskmist kontsentratsiooni või uuritava aine kontsentratsiooni muutumist kajastavaid mudeleid (3, 8).

Vetikate kasvu pidurdamise katse on dünaamilisem kui enamik muid veorganismidele mürgise toime määramise kiirkatseid. Sellepärast võib olla raske kindlaks teha tegelikku kokkupuutekontsentratsiooni, eriti kui uuritakse adsorbeeruvat ainet madalal kontsentratsioonil. Uuritava aine kadumine lahusest adsorbeerumise tõttu kasvavale vetikate biomassile ei tähenda sel juhul, et aine on katseüsteemist kadunud. Katsetulemuste analüüsimisel tuleb kontrollida, kas uuritava aine kontsentratsiooni vähenemisega katse ajal kaasneb kasvu pidurdumise vähenemine. Kui kasvu pidurdumine väheneb, võib kaaluda uuritava aine kontsentratsiooni vähenemist kajastava sobiva mudeli rakendamist (8). Kui kasvu pidurdamine ei vähene, võib olla sobiv kasutada tulemuste analüüsil nominaalset või mõõdetud algkontsentratsiooni.

1.8.12. **Muud tähelepanekud**

Inokulum-kultuuri vaadeldakse mikroskoobiga veendumaks, et kultuur on normaalse ja terve välimusega, ning katse lõpus uuritakse kultuuri mikroskoobiga, et avastada vetikate morfoloogilisi muutusi (mis võivad olla põhjustatud kokkupuutumisest uuritava ainega).

▼ **M1**1.8.13. **Piirsalduskatse**

Teatavatel asjaoludel, näiteks kui eelkatse näitab, et kontsentratsioonil kuni $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ või katsekeskkonnas lahustuvuse piirkontsentratsioonil (olenevalt sellest, kumb on madalam), ei avalda uuritav aine toksilist mõju, võib teha piirsalduskatse, milles võrreldakse kontrollrühmas ja ühes katserühmas (kontsentratsioonil $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ või lahustuvuse piirkontsentratsioonil) avalduvat mõju. Piirsalduskatse tegemisel soovitatakse kindlasti määrata ka kokkupuutekontsentratsioon. Kõik eespool kirjeldatud katsetingimused ja nõuetele vastavuse kriteeriumid on rakendatavad ka piirsalduskatse puhul, ent uuritava ainega tuleb teha vähemalt kuus paralleelkatset. Kontroll- ja katserühma kostemuutujate analüüsil võib keskvärtusi võrrelda statistilise kriteeriumi (nt Studenti t-kriteerium) abil. Kui kahe rühma dispersioonid erinevad, kasutatakse mittevõrdsete dispersioonide juhtumile kohandatud t-kriteeriumi.

1.8.14. **Muudatus intensiivse värvusega ainete määramise puhul**

Valgustatus (valguse intensiivsus) peaks olema käesolevas katsemetodis ette nähtud vahemiku ülemises otsas: $120 \text{ }\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$ või suurem.

Optilise tee pikkust tuleks lühendada katselahuste ruumala vähendamiseks (vahemikus 5–25 ml).

Tuleks tagada piisav segamine (näiteks mõõduka loksutamise), et vetikad võimalikult sageli satuksid hea valgustatuse tingimustesse kasvukeskkonna pinnal.

2. **KATSEANDMED**2.1. **KASVUKÕVERATE EHTAMINE**

Katsenõus olevat biomassi võib väljendada mõõtmisel kasutatud asendusparameetri (nt rakkude arvu, fluorestsentsi) ühikutes.

Katse- ja kontrollkultuurides määratud biomassi ning uuritava materjali kontsentratsioonid, mis registreeritakse vähemalt iga täistunni möödumisel, ja mõõtmise ajad kantakse tabelisse ja nende andmete põhjal ehitatakse graafik. Sel esimesel etapil võib olla vaja nii logaritmilist kui ka lineaarset skaalat, kuid logaritmiline skaala on kohustuslik ja üldiselt saab katse ajal esinevaid kasvulaadi muutusi selles paremini esitada. Logaritmilises skaalas saadakse eksponentsiaalse kasvu puhul sirge, mille tõus näitab kasvu erikiirust.

Kasvugraafikute abil kontrollitakse, kas kontrollkultuuride kasv on kogu katse jooksul eksponentsiaalne ja toimub eeldatud kiirusega. Iga andmepunkti ja graafikute kuju hinnatakse kriitiliselt veendumaks, et originaalandmetes ei ole vigu ja katse on läbi viidud korrektselt. Eriti kontrollitakse andmepunkte, mille kõrvalekaldu mises võib kahtlustada süstemaatilist viga. Kui katse läbiviimises saab tuvastada vea või selle olemasolu võib pidada väga tõenäoliseks, siis tähistatakse asjaomane punkt võõrväärtusena ja seda punkti ei arvestata hiljem statistilisel analüüsil. (Näiteks võib vetikate nullkontsentratsioon ühes kahest või kolmest paralleelnõust osutada sellele, et nõu ei inokuleeritud õigesti või see oli halvasti puhastatud.) Põhjused, miks teatavat andmepunkti käsitleti võõrväärtusena ja ei arvestatud, tuleb katseprotokollis selgesti esitada. Lubatavaks põhjuseks peetakse ainult (harva esinevaid) vigu katse läbiviimises, mitte aga vähest täpsust. Kõnesoleva küsimuse puhul saab statistilisi meetodeid võõrväärtuste kindlakstegemiseks kasutada üksnes piiratult ja need ei asenda eksperdi hinnangut. Edasisel katseandmete esitamisel graafiku või tabelina on soovitatav esitada koos muude punktidega ka võõrväärtustele vastavad (ja sellisena tähistatud) punktid.

▼ **M1**

2.2. KOSTEMUUTUJAD

Kõnesoleva katse eesmärk on määrata uuritava aine mõju vetikate kasvule. Kuna liikmesriikide eelistused ja reguleerimisvajadused on erinevad, käsitletakse käesolevas metoodikas kahte kostemuutajat. Et katsetulemused oleksid vastuvõetavad kõikides liikmesriikides, tuleb uuritava mõju hindamisel kasutada mõlemat järgnevalt kirjeldatud kostemuutajat (a ja b).

- a) Keskmine kasvu erikiirus: see kostemuutuja arvutatakse katse ajal toimunud biomassi juurdekasvu logaritmi alusel ja väljendatakse ühe ööpäeva kohta.
- b) Saagis: see kostemuutuja on biomasside vahe katse lõpus ja alguses.

Kui käesolevat meetodit rakendatakse ELi õigusraamistikus, peaksid tulemuste arvutused tagapool kirjeldatud põhjusi arvestades põhinema kasvu keskmisel erikiirusel. Tuleb märkida, et nende kahe kostemuutuja abil arvutatud toksilisuse väärtused ei ole võrreldavad ning seda erinevust tuleb katsetulemuste kasutamisel arvestada. Kui järgitakse käesoleva metoodika tingimusi, on asjaomaste lähenemiseviiside matemaatilise aluse eripära tõttu keskmisel kasvu erikiirusel põhinevad EC_x väärtused ($E_r C_x$) üldiselt suuremad kui saagise alusel saadud tulemused ($E_y C_x$). See erinevus ei ole tõlgendatav kahe kostemuutuja tundlikkuse erinevusena; asjaomased väärtused on lihtsalt matemaatiliselt erinevad. Keskmise kasvu erikiiruse mõiste põhineb vetikate üldisel eksponentsiaalsel kasvul piiramata kultuuris, kusjuures toksilisus määratakse kasvukiirusele avaldatava mõju alusel; see ei sõltu kontrollkultuuri kasvu erikiiruse tegelikust väärtusest, kontsentratsiooni-mõju sõltuvuse suurenemisest või katse kestusest. Kui kostemuutujaks on saagis, siis sõltuvad tulemused aga kõikidest mainitud kõrvalmuutujatest. $E_y C_x$ sõltub igas katses kasutatud vetikaliigi kasvu erikiirusest ja maksimaalsest kasvu erikiirusest, mis võib eri vetikaliikidel ja isegi ühe liigi eri tüvedel olla erinev. Seda kostemuutajat ei tohi kasutada, kui võrreldakse vetikaliikide või -tüvede tundlikkust toksiliste ainete suhtes. Kuigi kasvu erikiiruse kasutamine toksilisuse määramiseks on teaduslikult paremini põhjendatud, vaadeldakse käesolevas metoodikas toksilisuse määramist ka saagise põhjal, et võtta arvesse teatavate liikmesriikide praegusi nõudeid.

2.2.1. **Keskmine kasvukiirus**

Nii kontrollkultuuride kui uuritava ainega kultuuride puhul arvutatakse teatava ajavahemiku keskmine kasvu erikiirus nõus biomassi suurenemise logaritmist järgmise valemi abil:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \quad (\text{ööpäev}^{-1})$$

kus:

μ_{i-j} on keskmine kasvu erikiirus ajavahemikul $i-j$;

X_i on biomass ajahetkel i ;

X_j on biomass ajahetkel j .

▼ **M1**

Iga katse- ja kontrollrühma puhul arvutatakse kasvukiiruse keskmine väärtus ja selle dispersiooni hinnang.

Arvutatakse kogu katse (tavaliselt päevad 0–3) keskmine kasvu erikiirus, võttes aluseks inokuleerimiseks kasutatud nominaalse biomassi väärtuse, mitte biomassi mõõdetud algväärtuse, sest harilikult saadakse nii täpsem tulemus. Kui biomassi mõõtmise seade (nt läbivoolutsütomeeter) võimaldab määrata inokulumi biomassi piisavalt täpselt, võib lähtuda siiski biomassi mõõdetud algkontsentratsioonist. Kasvukiirusi hinnatakse ka lõikude kaupa, need väärtused arvutatakse iga ööpäeva kohta (katsepäevad 0–1, 1–2 ja 2–3) ja kontrollitakse, kas kontrollkultuuri kasvukiirus püsib muutumatuna (vt punkt 1.7, nõuetele vastavuse kriteerium). Kui esimesel katsepäeval leitakse üldisest keskmisest väärtusest oluliselt väiksem kasvu erikiirus, võib see osutada ootefaasi esinemisele. Kontrollkultuuri ootefaasi võib minimeerida või praktiliselt kõrvaldada eelkultuuri õige paljundamisega; uuritava ainega kultuuri puhul võib ootefaasi olemasolu osutada taastumisele esialgsest toksilise aine põhjustatud stressist või uuritava aine sisalduse vähenemisele seoses aine kaoga pärast kokkupuudet (ka sorptsiooni tõttu vetikate biomassil). Sellepärast võib kasvukiiruse lõikude kaupa hindamist kasutada ka selleks, et määrata uuritava aine mõju kokkupuuteaja jooksul. Lõikude kaupa leitud kasvukiiruste ja keskmise kasvukiiruse olulised erinevused osutavad kõrvalekaldumisele pidevast eksponentsiaalsest kasvust; sel juhul on kasvukõveraid vaja üksikasjalikult uurida.

Iga uuritavat ainet sisaldava paralleelkultuuri puhul arvutatakse kasvukiiruse pidurdumise protsent järgmise valemi abil:

$$\%I_r = \frac{\mu_C - \mu_T}{\mu_C} \times 100$$

kus:

$\%I_r$ on keskmise kasvu erikiiruse pidurdumise määr protsentides;

μ_C on keskmise kasvu erikiiruse (μ) keskvärtus kontrollrühmas;

μ_T on asjaomase uuritava ainega kultuuri keskmine kasvu erikiirus.

Kui katselahuste valmistamiseks kasutatakse lahusteid, tuleb pidurdumise määra arvutamisel kasutada lahustit sisaldavaid kontrollkultuure, mitte lahustivabasisid kontrollkultuure.

2.2.2. Saagis

Iga kontrollkultuuri või uuritava ainega kultuuri puhul arvutatakse saagis, lahutades biomassist katse lõpus biomassi katse alguses. Iga uuritava kontsentratsiooni ja kontrollkultuuri jaoks arvutatakse keskmine saagis ning selle dispersiooni hinnang. Saagise vähenemine protsentides ($\%I_y$) arvutatakse iga uuritava ainega paralleelkultuuri puhul järgmiselt:

$$\%I_y = \frac{(Y_C - Y_T)}{Y_C} \times 100$$

▼ M1

kus:

$%I_y$ on saagise vähenemine protsentides;

Y_C on kontrollrühma keskmine saagis;

Y_T on asjaomase uuritava ainega kultuuri saagis.

2.3. KONTSESTRATSIOONI-MÕJU KÕVERA EHITAMINE

Andmed kantakse graafikule koordinaadistikus, mis näitab protsentides väljendatud pidurdumismäära sõltuvust uuritava aine kontsentratsiooni logaritmist; graafikut uuritakse üksikasjalikult, jättes kõrvale kõik esimesel etapil kõrvale jäetud punktid. Läbi punktide ehitatakse käsitsi või arvutiinterpolatsiooni abil sujuv kõver, mis annab esmapildi kontsentratsiooni-mõju seosest; seejärel rakendatakse üksikasjalikumalt lähenemisviisi, eelistatavalt mõnda arvutistatistilist meetodit. Olenevalt andmete edasisest kasutamisest, kvaliteedist (täpsusest) ja hulgast ning andmete analüüsi vahendite kättesaadavusest, võidakse andmete analüüsimine sellega lõpetada (teatavatel juhtudel on see õigustatud) ning lihtsalt lugeda peamised väärtused EC_{50} ja EC_{10} (ja/või EC_{20}) silma järgi ehitatud kõveralt (vt ka stimuleerivat mõju käsitlev punkt allpool). Mõjuvad põhjused statistiliste meetodite kasutamisest loobumiseks võivad olla näiteks järgmised:

- andmed ei võimalda saada arvutimeetoditega usaldusväärsemaid tulemusi kui eksperdi hinnanguga – sellisel juhul võivad mõned arvutiprogrammid üldse mitte anda usaldusväärseid lahendeid (iteratsioonisammud võivad mitte koonduda jne);
- olemasolevad arvutiprogrammid ei võimalda adekvaatselt hinnata kasvu stimuleerivat mõju (vt allpool).

2.4. STATISTILISED MEETODID

Eesmärk on leida regressioonanalüüsi abil kvantitatiivne seos kontsentratsiooni ja mõju vahel. Võib kasutada kaalutud lineaarset regressiooni pärast kosteandmete lineariseerivat teisendamist näiteks probit-, logit- või Weibulli ühikute kujule (9), kuid eelistada tuleb siiski mittelineaarse regressiooni meetodeid, mis sobivad paremini vältimatute andmevigade ja sujuvast jaotusest kõrvalekallete puhul. Kui andmevead lähenevad null-pidurdusele või täielikule pidurdusele, võivad need teisendustel võimendada ja segada analüüsi (9). Tuleb silmas pidada, et probit-, logit- või Weibulli teisendusega standardised analüüsimeetodid on ette nähtud kõik-või-mitte-midagi-andmete (nt suremus või elulemus) analüüsiks ja kasvu või biomassi andmete analüüsimiseks tuleb neid kohandada. Konkreetseid meetodeid EC_x väärtuste määramiseks pidevate andmete alusel on esitatud publikatsioonides (10, 11, 12). Mittelineaarse regressiooni kasutamist on üksikasjalikult käsitletud 4. liites.

▼ **M1**

Kummagi kostemuutuja puhul arvutatakse kontsentratsiooni-mõju kõverast punkti EC_x hinnangud. Võimaluse korral määratakse iga hinnangu usaldusvahemik 95 % usaldusnivoo jaoks. Kosteandmete sobivust regressioonimudeliga hinnatakse graafiliselt või statistiliselt. Regressioonanalüüsiks ei kasutata katserühma keskvaartusi, vaid individuaalsete paralleelkultuuride koste väärtusi. Kui andmete suure hajuvuse tõttu on kõvera mittelineaarne lähendamine raske või võimatu, võib probleemi ületamiseks kasutada rühmade keskvaartuste regressioonanalüüsi – see on praktiline lähenemisviis, mis võimaldab vähendada oletatavate võõrväärtuste mõju. Selle võimaluse kasutamise korral tuleb katseprotokollis teha märkus, et kalduti kõrvale tavalisest toimimisviisist, kuna kõvera lähendamine individuaalsete paralleelkultuuride andmetega ei andnud head tulemust.

Kui tavalised regressioonimudelid ja -meetodid katseandmete puhul ei sobi, võib EC_{50} hinnangute ja usaldusvahemike leidmiseks kasutada ka lineaarset interpolaatsiooni koos andmete usaldusväärse iteratiivse kontrollimisega (*bootstrapping*) (13).

Selleks et määrata madalaim avastatava mõjuga kontsentratsioon, selle kaudu ka avastatava mõjuga kontsentratsioon ja kirjeldada uuritava aine mõju kasvukiirusele, on vaja võrrelda uuritava ainega kultuuride keskvaartusi dispersioonanalüüsi (ANOVA) abil. Iga kontsentratsiooni puhul leitud keskvaartust võrreldakse seejärel kontrollkultuuride keskvaartusega, kasutades sobivat mitmekordse võrdluse või trendikatse meetodit. Dunnetti või Williamsi test võib osutada sobivaks (14, 15, 16, 17, 18). Tuleb hinnata, kas kehtib dispersioonanalüüsi eeldus, et dispersioon on homogeenne. Selle hinnangu võib saada graafiliselt või formaaltesti abil (18). Sobivad Levene'i või Bartletti testid. Kui dispersioonide homogeensuse eeldus ei kehti, võib mõnikord olla abi andmete logaritmilisest teisendamisest. Kui dispersiooni heterogeensus on väga suur ja seda ei saa korrigeerida teisendamisega, tuleb kaaluda Jonkheere alanevate astmetega trendi testi kasutamist. Täiendavad juhised avastatava mõjuga kontsentratsiooni määramiseks on esitatud publikatsioonis (12).

Teaduse viimaste saavutuste põhjal on soovitatud loobuda avastatava mõjuga kontsentratsiooni mõistest ja asendada see regressioonist leitud punkti EC_x hinnangutega. Kõnesoleva katse jaoks vetikatel ei ole sobivat x väärtust veel kindlaks määratud. Nähtavasti on see väärtus 10–20 % vahemikus (olenevalt valitud kosteparameetrist); parem oleks esitada nii EC_{10} kui ka EC_{20} .

2.5. KASVU STIMULEERIMINE

Mõnikord täheldatakse madalatel kontsentratsioonidel kasvu stimuleerimist (negatiivne pidurdumine). Selle põhjuseks võib olla hormeets (mürgise aine stimuleeriv toime) või kasutatud minimaalsöötmele stimuleeriva kasvufaktori lisamine katsematerjaliga. Tuleb arvestada, et anorgaaniliste toitainete lisamine ei peaks avaldama otsest mõju, sest katsekeskkonnas on kogu katse vältel toitaineid liiaga. Tavaliselt võib EC_{50} arvutamisel väikeste dooside stimuleerivat mõju mitte arvestada, kui see mõju ei ole liiga suur. Kui stimuleeriv mõju on väga suur või on vaja leida EC_x väärtus väikese x puhul, võib vaja minna erimeetmeid. Võimaluse korral tuleb vältida stimuleerimist kajastavate tulemuste väljajätmist andmeanalüüsist; kui olemasolev kõveraga lähendamise tarkvara ei võimalda nõrka stimuleerimist töödelda, võib kasutada lineaarset interpolaatsiooni koos andmete usaldusväärse iteratiivse kontrollimisega. Kui stimuleerimine on väga tugev, võib kaaluda hormeetsimudeli kasutamist (19).

▼ M1

2.6. KASVU PIDURDAMINE MITTETOKSILISTE AINETEGA

Valgust neelavad uuritavad materjalid võivad vähendada kasvukii-
rust, kuna varjestamine vähendab kättesaadavat valgust. Sedalaadi
füüsikalised mõjud tuleb toksilisest mõjust katsetingimuste muutmi-
sega lahku viia, ja füüsikalisi mõjusid tuleb kirjeldada eraldi. Asja-
omased juhtnõõrid on esitatud publikatsioonides (2, 3).

3. TULEMUSTE ESITAMINE

3.1. KATSEPROTOKOLL

Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav aine:

- füüsikaline iseloomustus ja asjakohased füüsikalis-keemilised omadused, kaasa arvatud lahustuvus vees;
- keemiline iseloomustus, kaasa arvatud puhtusaste.

Katseorganismi liik:

- tüvi, päritolukollektsioon või eraldamise koht, kasutatud kultiveerimistingimused.

Katsetingimused:

- katse alustamise kuupäev ja katse kestus;
- katseplaani kirjeldus: katsenõud, kultuuri mahud, biomassi tihedus katse alguses;
- söötme koostis;
- uuritud kontsentratsioonid ja paralleelkultuurid (paralleelkultuuride arv, uuritud kontsentratsioonide arv, kasutatud geomeetriline progressioon);
- katselahuste valmistamise kirjeldus, sh lahustite kasutamine jne;
- kultiveerimisseade;
- valguse intensiivsus ja kvaliteet (valgusallikas, valguse ühtlus);
- temperatuur;
- uuritud kontsentratsioonid: nominaalsed uuritud kontsentratsioonid ja katsenõudes oleva uuritava aine kontsentratsiooni määramise tulemused. Märgitakse meetodi tulemuslikkus ja uuritavas süsteemis määratav minimaalne kontsentratsioon;
- kõik kõrvalekaldumised käesolevast metoodikast;
- biomassi määramise meetod ning mõõdetava parameetri ja kuivmassi korrelatsiooni tõendid.

Katsetulemused:

- pH väärtused kõikide katsete alguses ja lõpus;
- biomass igas kolvis igas mõõtmispunktis ning biomassi mõõtmise meetod;

▼ M1

- kasvukõverad (graafikud, kuidas biomass muutus aja muutudes);
- iga uuritava ainega paralleelkultuuri puhul arvatud kostemuutujate väärtused, keskvaartused ja paralleelkultuuride variatsioonikordaja;
- graafik, kuidas mõju sõltub kontsentratsioonist;
- kostemuutujate (nt EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀) abil väljendatud toksilisuse hinnangud ja nende usaldusvahemikud. Madalaim avastatava mõjuga kontsentratsioon ja ka avastatava mõjuta kontsentratsioon (kui need arutati) ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;
- kui kasutati dispersioonanalüüsi (ANOVA), siis avastatava efekti suurus (nt väikseim oluline erinevus);
- uuritava ainega kultuuris jälgitud kasvu stimuleerimine;
- muu täheldatud mõju, nt vetikate morfoloogilised muutused;
- tulemuste arutelu, kaasa arvatud käesolevast metoodikast kõrvalekaldumise võimalik mõju katsetulemustele.

4. KIRJANDUS

- 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 phytoplankton 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**

I. liide

Tüved, mille sobivus katseks on tõendatud**Rohevetikad**

- *Pseudokirchneriella subcapitata* (varasem liiginimi *Selenastrum capricornutum*), ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG
- *Desmodesmus subspicatus* (varasem liiginimi *Scenedesmus subspicatus*), 86.81 SAG

Ränivetikad

- *Navicula pelliculosa*, UTEX 664

Tsüanobakterid

- *Anabaena flos-aquae*, UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A
- *Synechococcus leopoliensis*, UTEX 625, CCAP 1405/1

Tüvede kollektioonid

Soovitatud tüved on kättesaadavad vetikate monokultuuridena järgmistest kollektioonidest (tähestikulises järjestuses):

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

D-3400 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****Soovitavate liikide väline iseloomustus ja omadused**

	<i>P. subcapitata</i>	<i>D. subspicatus</i>	<i>N. pelliculosa</i>	<i>A. flos-aquae</i>	<i>S. leopoliensis</i>
Väline iseloomustus	Kõverdunud kruvijad eraldi rakud	Ovaalsed enamasti eraldi rakud	Kepikesed	Ovaalsete rakkude ahelad	Kepikesed
Mõõtmed (pikkus × läbimõõt) µm	8–14 × 2–3	7–15 × 3–12	7,1 × 3,7	4,5 × 3	6 × 1
Rakumaht (µm ³ /rakk)	40–60 ⁽¹⁾	60–80 ⁽¹⁾	40–50 ⁽¹⁾	30–40 ⁽¹⁾	2,5 ⁽²⁾
Raku kuivmass (mg/rakk)	2–3 × 10 ⁻⁸	3–4 × 10 ⁻⁸	3–4 × 10 ⁻⁸	1–2 × 10 ⁻⁸	2–3 × 10 ⁻⁹
Kasvukiirus ⁽³⁾ (ööpäev ⁻¹)	1,5–1,7	1,2–1,5	1,4	1,1–1,4	2,0–2,4

⁽¹⁾ Määratud elektroonilise osakestelenduri abil.

⁽²⁾ Arvutatud mõõtmete alusel.

⁽³⁾ Kõige sagedamini tähtsustatav kasvukiirus OECD söötmel, kui valgustatus on 70 µEm⁻² s⁻¹ ja temperatuur 21 °C.

Konkreetsed soovitused soovitavate katseliikide kultiveerimiseks ja käitlemiseks*Pseudokirchneriella subcapitata* ja *Desmodesmus subspicatus*

Neid rohevetikaid on üldiselt kerge säilitada erinevatel söötmetel. Teavet sobivate söötmete kohta võib saada vetikakultuuri kollektsioonidest. Tavaliselt on rakud eraldi ja rakkude kontsentratsiooni on kerge määrata elektroonilise osakestelenduri või mikroskoobi abil.

Anabaena flos-aquae

Tüvikultuuri säilitamiseks võib kasutada erinevaid söötmeid. Portskultuuri uuendamisel on eriti tähtis vältida kasvu väljumist logaritmilisest faasist, sest logaritmilise kasvu taastamine on raske.

Anabaena flos-aquae areneb kokkukeerdunud rakuahelate kogumitena. Olenevalt kultiveerimistingimustest võib nende rakukogumite suurus olla erinev. Kui biomassi määramiseks kasutatakse loendamist mikroskoobi abil või elektroonilist osakestelendurit, võib olla vaja neid rakukogumeid lõhkuda.

Kõikumiste vähendamiseks rakkude loendamisel võib rakuahelad lõhkuda, töödeldes osaproove ultraheliga. Kui osaproove töödeldakse ultraheliga kauem, kui on vaja rakuahelate lõhkumiseks, siis võivad rakud puruneda. Ultraheliga töötlemise intensiivsus ja kestus peab olema kõigis katsetes ühesugune.

Tulemuste kõikumise kompenseerimiseks peab hemotsütomeetri abil loendatud väljade arv olema küllaldane (vähemalt 400 raku). See muudab rakkude kontsentratsiooni mikroskoobiga määramise usaldusväärsemaks.

Pärast rakuahelate lõhkumist hoolika ultrahelitöötuse abil võib *Anabaena* rakkude üldmahu määramiseks kasutada elektroonilist osakestelendurit. Ultraheli energia tuleb nii reguleerida, et rakud jääksid terveks.

Katsenõude inokuleerimiseks kasutatava vetikasuspensiooni hea läbisegatuse ja homogeensuse tagamiseks kasutatakse pöörisesegajat.

▼ M1

Katsenõud asetatakse orbitaal- või võnkloksuti lauale töörežiimil ligikaudu 150 pööret minutis. *Anabaena* rakukogumite moodustumist võib takistada ka perioodilise loksutamiseega. Kui rakukogumid siiski tekivad, tuleb jälgida, et biomassi mõõtmiseks võetavad proovid oleksid representatiivsed. Võib olla vajalik kultuuri tugev segamine, et lõhkuda vetikakogumid enne proovi võtmist.

Synechococcus leopoliensis

Tüvikultuuri säilitamiseks võib kasutada erinevaid söötmeid. Teavet sobivate söötmete kohta võib saada vetikakultuuri kolleksioonidest.

Synechococcus leopoliensis kasvab eraldi kepikesekujuliste rakkudena. Rakud on väga väikesed, mis raskendab biomassi mõõtmist rakkude loendamisega mikroskoobi abil. Võib kasutada elektroonilist osakesteloeendurit, mis võimaldab loendada osakesi läbimõõduga alates 1 µm. Võib kasutada ka fluorimeetrilisi mõõtmisi *in vitro*.

Navicula pelliculosa

Tüvikultuuri säilitamiseks võib kasutada erinevaid söötmeid. Teavet sobivate söötmete kohta võib saada vetikakultuuri kolleksioonidest. Tuleb silmas pidada, et sõõde peab sisaldama silikaati.

Navicula pelliculosa võib teatavates kasvutingimustes moodustada rakukogumeid. Lipiidide moodustumise tõttu võivad vetikarakud mõnikord koguneda õhukesse pinnakihti. Sel juhul tuleb biomassi määramiseks vajalike osaproovide võtmisel rakendada erimeetmeid selleks, et proovid oleksid representatiivsed. Näiteks võib vaja minna intensiivset segamist pöörisesgajaga.

▼ **M1**

2. liide

Söötmed

Võib kasutada ühte järgmistest söötmetest.

OECD sööde: originaalsööde OECD TG 201, vastab ka standardile ISO 8692.

US EPA sööde AAP, vastab ka standardile ASTM.

Nende söötmete valmistamisel kasutatakse keemiliselt või analüütiliselt puhtaid kemikaale ja deioniseeritud vett.

USA Keskkonnakaitseagentuuri (U.S. EPA) AAP-söötme ja OECD eeskirjas 201 ette nähtud söötme koostis

Koostisaine	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 ₄ Cl			15,0	0,280
MgCl ₂ ·6(H ₂ O)	12,16	0,0598	12,0	0,0590
CaCl ₂ ·2(H ₂ O)	4,41	0,0300	18,0	0,122
MgSO ₄ ·7(H ₂ O)	14,6	0,0592	15,0	0,0609
K ₂ HPO ₄	1,044	0,00599		
KH ₂ PO ₄			1,60	0,00919
FeCl ₃ ·6(H ₂ O)	0,160	0,000591	0,0640	0,000237
Na ₂ EDTA·2(H ₂ O)	0,300	0,000806	0,100	0,000269 (*)
H ₃ BO ₃	0,186	0,00300	0,185	0,00299
MnCl ₂ ·4(H ₂ O)	0,415	0,00201	0,415	0,00210
ZnCl ₂	0,00327	0,000024	0,00300	0,0000220
CoCl ₂ ·6(H ₂ O)	0,00143	0,000006	0,00150	0,00000630
Na ₂ MoO ₄ ·2(H ₂ O)	0,00726	0,000030	0,00700	0,0000289
CuCl ₂ ·2(H ₂ O)	0,000012	0,00000007	0,00001	0,00000006
pH	7,5		8,1	

(*) EDTA ja raua moolsuhe on veidi suurem kui 1. See hoiab ära raua sadestumise, samas kui kelaatide moodustumine raskmetallide ioonidega on minimaalne.

Kui katses kasutatakse ränivetikat *Navicula pelliculosa*, lisatakse kummalegi söötmele Na₂SiO₃·9H₂O kontsentratsioonini 1,4 mg Si/l.

Nõutav söötme pH saavutatakse, kui söötme karbonaatsüsteem on tasakaalus CO₂ partsiaalrõhuga atmosfääriõhus. pH väärtus ja vesinikkarbonaadi molaarne kontsentratsioon 25 °C juures on omavahel seotud järgmise ligikaudse võrrandiga:

$$PH_{eq} = 11,30 + \log [HCO_3]$$

▼ **M1**

Kui NaHCO_3 sisaldus on 15 mg/l, siis $\text{pH}_{\text{eq}} = 7,5$ (U.S. EPA sööde); kui NaHCO_3 sisaldus on 50 mg/l, siis $\text{pH}_{\text{eq}} = 8,1$ (OECD sööde).

Elementide sisaldus katsesöötmes

Element	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

OECD söötme valmistamine

Toitaine	Sisaldus põhilahuses
Põhilahus 1: makrotoitained	
NH_4Cl	1,5 g·l ⁻¹
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,2 g·l ⁻¹
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,8 g·l ⁻¹
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1,5 g·l ⁻¹
KH_2PO_4	0,16 g·l ⁻¹
Põhilahus 2: raud	
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	64 mg·l ⁻¹
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100 mg·l ⁻¹
Põhilahus 3: mikroelemendid	
H_3BO_3	185 mg·l ⁻¹
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	415 mg·l ⁻¹
ZnCl_2	3 mg·l ⁻¹
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 mg·l ⁻¹
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,01 mg·l ⁻¹
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	7 mg·l ⁻¹
Põhilahus 4: vesinikkarbonaat	
NaHCO_3	50 g·l ⁻¹
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	

Põhilahused steriliseeritakse membraanfiltrimise (keskmine poori läbimõõt 0,2 µm) või autoklaavimise (120 °C, 15 min) abil. Lahuseid hoitakse valguse juurdepääsuta 4 °C juures.

Põhilahuseid 2 ja 4 ei autoklaavita, vaid steriliseeritakse membraanfiltrimise abil.

▼ M1

Söötme valmistamiseks lisatakse veele vajalikud mahud põhilahuseid 1–4.

500 ml steriliseeritud veele lisatakse:

- 10 ml põhilahust 1;
- 1 ml põhilahust 2;
- 1 ml põhilahust 3;
- 1 ml põhilahust 4.

Lahuse ruumala viiakse steriliseeritud veega 1 000 milliliitrini.

Lahusel lastakse piisavalt kaua seista, et sööde saavutaks tasakaalu atmosfääris oleva süsihappegaasiga; vajaduse korral barboteeritakse mõne tunni jooksul läbi lahuse filtritud steriilset õhku.

AAP-söötme valmistamine

- A1.1. Ligikaudu 900 ml deioniseeritud või destilleeritud veele lisatakse *a* 1 ml põhilahuseid A1.2.1–A1.2.7 ja saadud lahuse ruumala viiakse 1 liitrini.
- A1.2. Makrotoitainete põhilahuse valmistamiseks lahustatakse 500 ml deioniseeritud või destilleeritud vees järgmised kogused aineid. Reaktiivikogustest A1.2.1, A1.2.2, A1.2.3 ja A1.2.4 võib valmistada ühe kombineeritud põhilahuse.
- A1.2.1. NaNO_3 – 12,750 g.
- A1.2.2. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 6,082 g.
- A1.2.3. $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 2,205 g.
- A1.2.4. Mikrotoitainete põhilahus – (vt A1.3).
- A1.2.5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 7,350 g.
- A1.2.6. K_2HPO_4 – 0,522 g.
- A1.2.7. NaHCO_3 – 7,500 g.
- A1.2.8. $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ – vt märkus A1.1.

Märkus A1.1. Kasutatakse ainult ränivetikatel tehtavates katsetes. Võib lisada otse (202,4 mg) või põhilahuse koostises, nii et räni lõppkontsentratsioon söötmes oleks 20 mg/l.

- A1.3. Mikroelementide põhilahuse saamiseks lahustatakse 500 ml deioniseeritud või destilleeritud vees järgmised kogused aineid.
- A1.3.1. H_3BO_3 – 92,760 mg.
- A1.3.2. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 207,690 mg.
- A1.3.3. ZnCl_2 – 1,635 mg.
- A1.3.4. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 79,880 mg.
- A1.3.5. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,714 mg.
- A1.3.6. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 3,630 mg.
- A1.3.7. $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,006 mg.
- A1.3.8. $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 150,000 mg

[dinaatrium(etüleendinitriilo)tetraatsetaat].

▼M1

- A1.3.9. $\text{Na}_2\text{SeO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,005 mg, vt märkus A1.2.
Märkus A1.2. Kasutatakse ainult ränivetikaliikide tüvikultuuride jaoks ette nähtud söötmetes.
- A1.4. pH reguleeritakse väärtusele $7,5 \pm 0,1$, kasutades 0,1 N või 1,0 N NaOH või HCl lahust.
- A1.5. Sööde filtritakse steriilsesse nõusse läbi 0,22 μm membraanfiltrit (kui kasutatakse osakeste loendurit) või 0,45 μm membraanfiltrit (kui osakeste loendurit ei kasutata).
- A1.6. Kuni kasutamiseni hoitakse söödet valguse juurdepääsuta 4 °C juures.

▼ **M1**

3. liide

Vetikate kultiveerimiskatse näide**Üldised märkused**

Allpool on kirjeldatud vetikakultuuride saamist mürgisuse määramise katsete jaoks.

Tuleb rakendada kohaseid meetmeid, et hoida ära vetikakultuuride nakatumine bakteritega. Puhaskultuuri kasutamine võib olla eelistatav, kuid on vaja saada selline kultuur, mis sisaldaks ainult ühte vetikat, ja kasutada seda.

Bakterite või teiste vetikatüvedega saastumise vältimiseks töötatakse steriilsetes tingimustes.

Seadmed ja materjalid

Vt „Meetodi kirjeldus: seadmed“.

Vetikakultuuride saamine*Toitainelahuste (söötmete) valmistamine*

Kõikidest söötmeks vajalikest toitesooladest valmistatakse kontsentreeritud põhilahused, mida hoitakse valguse juurdepääsuta ja jahedas kohas. Need lahused steriliseeritakse filtrimise või autoklaavimisega.

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

Tüvikultuur

Tüvikultuur on väikesemahuline vetikakultuur, mida kantakse korrapäraselt üle värskesse söötmesse ja kasutatakse katse algmaterjalina. Kui tüvikultuuri pidevalt ei kasutata, külvatakse see viirgudena kaldagariga katseklaasi. Kaldagarilt kantakse tüvikultuur ümber värskele söötmele vähemalt üks kord kahe kuu jooksul.

Tüvikultuure kasvatatakse sobiva söötmega koonilistes kolbides (maht ligikaudu 100 ml). Vetikate inkubeerimisel pideva valguse käes 20 °C juures tuleb neid iga nädal üle kanda.

Teatav kogus vana kultuuri kantakse steriilse pipetiga üle värske söötmega kolbi nii, et kiirelt kasvava liigi puhul oleks algkontsentratsioon ligikaudu 100 korda väiksem kui vanas kultuuris.

Liigi kasvukiiruse võib määrata kasvukõveralt. Kui see on teada, on võimalik hinnanguliselt määrata kultuuri uude söötmesse ülekandmiseks vajalik kontsentratsioon. Seda on vaja teha enne, kui kultuur jõuab suremisfaasi.

Eelkultuur

Eelkultuur on mõeldud vetikakoguse saamiseks, mis sobib uuritava ainega kultuuride inokuleerimiseks. Eelkultuuri inkubeeritakse katse tingimustes ja kasutatakse siis, kui see on veel eksponentsiaalse kasvu faasis, harilikult pärast 2–4 päeva kestnud inkubeerimist. Kui vetikakultuur sisaldab moondundud või ebanormaalseid rakke, praagitakse kultuur välja.

▼ **M1**

4. liide

Andmete töötlemine mittelineaarse regressiooni abil**Üldised märkused**

Vetikate ja muude mikroorganismide kasvu katsetes on kostemuutujaks protsessi kiirus, kui kasutatakse kasvukiirust, või selle integraal aja järgi, kui kasutatakse biomassi (biomassi kasv on pidev ehk mõõdetav muutuja). Kumbagi muutujat võrreldakse vastava keskmise kostemuutuja väärtusega paralleelsetes kontrollkultuurides, mis ei sisalda uuritavat ainet, kusjuures tingimused (vetikakaste puhul on peamised määraavad tegurid valgus ja temperatuur) on valitud nii, et koste oleks maksimaalne. Tegemist on hajus- ehk homogeense süsteemiga, mille biomassi võib vaadelda kontiinumina, arvestamata individuaalseid rakke. Sellise süsteemi koste dispersiooni jaotus sõltub üksnes katsetingimustest (harilikult on vea jaotus lognormaalne või normaalne). Olukord on teistsugune kui tavaliste biotestide puhul, millest saadakse kõik-või-mitte-midagi-andmeid, mille korral sageli eeldatakse, et dispersiooni põhikomponent on – tavaliselt binomiaaljaotusega – individuaalsete organismide taluvus. Antud juhul on null- ehk taustase-meks kontrollkultuuridega saadud koste.

Lihtsal juhul väheneb normeeritud ehk suhteline koste r monotoonselt alates väärtusest 1 (nullpidurdus) kuni väärtuseni 0 (täielik pidurdus). Tuleb silmas pidada, et koste mõõtmine on seotud veaga ja näilist negatiivset pidurdust võib töödelda üksnes kui juhuvea tulemust.

Regressioonianalüüs*Mudelid*

Regressioonianalüüsi eesmärk on esitada kontsentratsiooni-mõju kõver kvantitatiivselt kas matemaatilise regressioonifunktsiooni $Y = f(C)$ kujul või sagedamini funktsioonina $F(Z)$, kus $Z = \log C$. Pöördfunktsioon $C = f^{-1}(Y)$ võimaldab arvutada EC_x väärtused EC_{50} , EC_{10} ja EC_{20} ning nende usaldusvahemikud usaldusnivool 95 %. Vetikate kasvu pidurdamise katsetes on kontsentratsiooni mõju kirjeldamisel edukalt kasutatud mitut lihtsat matemaatilist funktsiooni. Sellisteks funktsioonideks on näiteks logistiline võrrand, mittedünaamiline Weibulli võrrand ja lognormaalne jaotusfunktsioon, mis kõik kujutavad endast sigmoidkõveraid ning lähenevad 1-le, kui $C \rightarrow 0$, ja 0-le, kui $C \rightarrow \infty$.

Viimasel ajal on asümptootiliste mudelite alternatiiviks pakutud pideva lävivõime funktsiooni mudeleid (nt Kooijmani mudel populatsiooni kasvu pidurdamise kirjeldamiseks, Kooijman *et al.* 1996). Kooijmani mudeli puhul eeldatakse, et teatavast kontsentratsiooni läviväärtusest EC_{0+} allpool uuritav aine ei mõju; see läviväärtus määratakse, ekstrapoleerides kontsentratsiooni-mõju kõverat lõikumiseni kontsentratsiooniteljega, kasutades selleks lihtsat pidevat funktsiooni, mis algpunktis ei ole diferentseeritav.

Analüüs võib seisneda lihtsalt hälvetel ruutude summa minimeerimises (oletades, et dispersioon on konstantne) või kaalutud hälvetel ruutude summa minimeerimises (kui dispersiooni heterogeensus on kompenseeritud).

▼ **M1***Analüüsi käik*

Analüüsi käiku võib kirjeldada järgmiselt. Valitakse sobiv funktsioon $Y = f(C)$ ja lähendatakse see katseandmetega mittelineaarse regressiooni abil. Et saada katseandmetest võimalikult palju teavet, on parem mitte kasutada paralleelkultuuridest leitud keskmisi väärtusi, vaid iga üksiku kolvi puhul saadud mõõteväärtusi. Teisest küljest näitavad kogemused, et kui dispersioon on suur, võib paralleelkultuuride keskmise väärtuse kasutamine anda usaldusväärsema, katseandmete juhuslikest vigadest vähem mõjutatud matemaatilise hinnangu kui iga indivi-duaalse andmepunkti kasutamine.

Lähendatud kõver ja mõõdetud andmed kantakse graafikule ning kontrollitakse kõvera ja andmete sobivust. Selleks võib olla eriti kasulik rakendada hälvete analüüsi. Kui kontsentratsiooni-mõju kirjeldamiseks valitud funktsionaalseos ei kajasta hästi kogu kõverat või mõnda selle olulist osa, nt madalate kontsentratsioonide mõju, valitakse lähendamiseks muu kõver – näiteks võib sümmeetrilise kõvera asemel valida Weibulli funktsioonile vastava mittesümmeetrilise kõvera. Negatiivne pidurdus võib olla probleemiks näiteks lognormaalse jaotusfunktsiooni korral ja vajada samuti alternatiivset regressioonifunktsiooni. Sellistele negatiivsetele väärtustele ei soovitata omistada nullväärtust või väikesi positiivseid väärtusi, kuna see moonutab vigade jaotust. Võib olla vaja lähendada teatavaid kõvera osi eraldi, nt lähendada eraldi nõrga pidurduse osa $EC_{\text{madal } x}$ väärtuste hindamiseks. Lähendatud võrrandi ja pöördfunktsiooni $C = f^{-1}(Y)$ abil arvutatakse iseloomulike punktide EC_x hinnangud, kusjuures katseprotokolli kantakse vähemalt EC_{50} hinnang ning üks või kaks $EC_{\text{madal } x}$ hinnangut. Kogemused on näidanud, et vetikakatsete täpsus võimaldab mõistliku täpsusega hindamist tavaliselt 10-protsendilise pidurdustaseme juures, kui andmepunkte on küllaldaselt ja madalatel kontsentratsioonidel ei esine segavat kasvu stimuleerimist. EC_{20} hinnang on sageli oluliselt täpsem kui EC_{10} hinnang, kuna EC_{20} asub harilikult kontsentratsiooni-mõju kõvera keskmises, ligikaudu lineaarses osas. Kasvu stimuleerimise tõttu on EC_{10} väärtusi mõnikord raske tõlgendada. Sellepärast soovitatakse, et kuigi EC_{10} on piisava täpsusega määratav, oleks katseprotokollis alati esitatud ka EC_{20} .

Kaalutegurid

Dispersioon katses ei ole üldiselt konstantne ja sisaldab harilikult võrdelist komponenti, sellepärast on tavaliselt parem kasutada kaalutud regressiooni. Tavaliselt eeldatakse sellise analüüsi puhul, et kaalutegur on pöördvõrdeline dispersiooniga:

$$W_i = 1/\text{Var}(r_i)$$

Paljud regressiooniprogrammid võimaldavad valida kaalutud regressioonanalüüsi tabelites esitatud kaalutegurite kasutamisega. Sobiv on kaalutegurid normeerida; selleks korrutatakse need teguriga $n/\sum w_i$ (n on andmepunktide arv), nii et kõikide kaalutegurite summa on 1.

Koste normeerimine

Normeerimine kontrollkatse keskmise koste abil tekitab teatavaid põhimõttelisi raskusi ja muudab dispersiooni struktuuri üsna keeruliseks. Kui pidurdusprotsendi saamiseks jagatakse koste väärtus kontrollkatse koste keskvaartusega, siis tuuakse sisse lisaviga, kuna kontrollkatse koste keskvaartus ise on määratud veaga. Kui see viga ei ole tühiselt väike, tuleb regressiooni kaalutegureid ja usaldusintervalle parandada, arvestades kontrolli kovariatsiooni (17). Tuleb silmas pidada, et kontrolli koste keskvaartuse täpne määramine on oluline suhtelise koste ülddispersiooni vähendamiseks. Seda dispersiooni kirjeldab järgmine valem,

▼ **M1**

milles alaindeks i märgib kontsentratsiooni i ja alaindeks 0 – kontrollkultuuri:

$$Y_i = \text{suhteline koste} = r_i/r_0 = 1 - I = f(C_i)$$

mille dispersioon on järgmine:

$$\text{Var}(Y_i) = \text{Var}(r_i/r_0) \cong (\partial Y_i / \partial r_i)^2 \cdot \text{Var}(r_i) + (\partial Y_i / \partial r_0)^2 \cdot \text{Var}(r_0)$$

ja kuna

$$(\partial Y_i / \partial r_i) = 1/r_0 \text{ ja } (\partial Y_i / \partial r_0) = -r_i/r_0^2$$

andmete dispersiooni normaalkaotuse ja paralleelkultuuride arvu m_i ja m_0 puhul:

$$\text{Var}(r_i) = \sigma^2/m_i$$

siis suhtelise koste summaarne dispersioon Y_i võrdub:

$$\text{Var}(Y_i) = \sigma^2/(r_0^2 m_i) + r_i^2 \cdot \sigma^2/r_0^4 m_0$$

Kontrollkultuuride koste keskvaartuse viga on pöördvõrdeline ruutjuurega keskmistatud kontrollkultuuride arvust; sellepärast on vea oluliseks vähendamiseks mõnikord õigustatud varasemate andmete arvestamine. Teine võimalus on loobuda andmete normeerimisest ja kasutada lähendamisel absoluutseid koste väärtusi, kaasa arvatud kontrollkultuuride koste väärtused, kusjuures kontrollkultuuri koste väärtust käsitletakse mittelineaarse regressiooni abil lähendatava täiendava parameetriga. Tavalise kaheparameetriselise regressioonivõrrandi puhul nõuab see meetod lähendamist kolme parameetri järgi, järelikult on meetodi kasutamiseks vaja rohkem andmepunkte kui mittelineaarse regressiooni läbiviimiseks andmetega, mida on normeeritud eelnevalt kindlaks määratud kontrollkultuuri koste väärtuse abil.

Usaldusvahemike pöördhinnangud

Mittelineaarse regressiooni usaldusvahemike arvutamine pöördhinnangu abil on üsna keeruline ega kuulu tavaliste statistilise tarkvara pakettide standardvariantides ette nähtud võimaluste hulka. Ligikaudsed usaldusvahemikud võib leida standardse mittelineaarse regressiooni programmide abil, kasutades ümberparameetriseerimist (Bruce and Versteeg, 1992), mille puhul matemaatiline võrrand kirjutatakse ümber nii, et määratavateks parameetriteks on otsitavad punktide hinnangud, (nt EC_{10} ja EC_{50}). Kui funktsioon on $I = f(\alpha, \beta, \text{kontsentratsioon})$, kasutatakse määratlusi $f(\alpha, \beta, EC_{10}) = 0,1$ ja $f(\alpha, \beta, EC_{50}) = 0,5$ selleks, et asendada funktsioon $f(\alpha, \beta, \text{kontsentratsioon})$ ekvivalentse funktsiooniga $g(EC_{10}, EC_{50}, \text{kontsentratsioon})$.

Otsesema arvutusviisi kasutamisel (Andersen *et al.*, 1998) säilitatakse võrrand originaalkujul ja arendatakse funktsioon Tayloriga r_i ja r_0 keskvaartuste ümbruses.

Viimasel ajal on saanud populaarseks andmete usaldusväärsuse iteratiivsel kontrollil põhinevad (*boot strap*) meetodid. Nende meetodite puhul kasutatakse empiirilise dispersioonijaotuse saamiseks katseandmeid ja sagedast korduvat valimi moodustamist, mida suunatakse juhuslike arvude generaatori abil.

KIRJANDUS

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. KOHESE BIOLAGUNDUVUSE MÄÄRAMINE****I OSA ÜLDPÕHIMÕTTED****I.1. SISSEJUHATUS**

Kirjeldatakse kuut katsemeetodit, mis sobivad kemikaalide kohese biolagunduvuse sõelkatseteks aeroobses veekeskkonnas:

- a) lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) kõrvaldamine (meetod C.4-A);
- b) muudetud OECD sõelkatse – DOC kõrvaldamine (meetod C.4-B);
- c) süsinikdioksiidi (CO₂) eraldumine (muudetud Sturmi katse) (meetod C.4-C);
- d) manomeetriline respirometria (meetod C.4-D);
- e) kinnise pudeli katse (meetod C.4-E);
- f) MITI (Jaapani Väliskaubandus- ja Tööstusministeeriumi) katse (meetod C.4-F).

Kõigi kuue katse üldpõhimõtted on esitatud meetodi I osas. Üksikute meetodite spetsiifilised osad on esitatud II–VII osas. Lisades on toodud määratlused, valemid ja suunismaterjalid.

1988. a tehtud OECD laboritevaheline võrdluskatse näitas, et nende meetoditega saadakse ühtseid tulemusi. Siiski võib mõni meetod olenevalt aine füüsikalistest omadustest olla eelistatav.

I.2. SOBIVA MEETODI VALIMINE

Sobivaima meetodi valikul on olulised andmed kemikaali lahustuvuse, aururõhu ja adsorptsiooniomaduste kohta. Teoreetiliste väärtuste arvutamisel ja/või mõõdetud väärtuste, nt ThOD, ThCO₂, DOC, TOC, COD (vt 1. ja 2. liide) kontrollimisel on vaja teada aine keemilist struktuuri või valemit.

Aineid, mille lahustuvus vees on vähemalt 100 mg/ml, võib analüüsida kõigi meetoditega eeldusel, et ained ei ole lenduvad ega adsorbeeruvad. Tabelis 1 on märgitud meetodid, mis sobivad vees vähelahustuvate, lenduvate või adsorbeeruvate kemikaalide puhul. Vees vähelahustuvate ja lenduvate kemikaalide käsitlemisviise on kirjeldatud 3. liites. Mõõdukalt lenduvaid kemikaale võib uurida DOC kõrvaldamise katse eeldusel, et katseanumates (mis peaksid olema sobival moel suletud) on küllaldaselt vaba ruumi gaasifaasile. Sellisel juhul tuleb füüsikaliste kadude arvessevõtmiseks teha ka abiootiline kontrollkatse.



Tabel 1

Katsemeetodite kohaldatavus

Katse	Analüüsimeetod	Sobivus ainetele, mis on:		
		vähelahustuvad	lenduvad	adsorbeeruvad
DOC kõrvaldamine	Lahustunud orgaaniline süsinik	—	—	+/-
Muudetud OECD sõelkatse	Lahustunud orgaaniline süsinik	—	—	+/-
CO ₂ eraldumine	Respiromeetria: CO ₂ eraldumine	+	—	+
Manomeetriline respiromeetria	Manomeetriline respiromeetria: hapniku tarbimine	+	+/-	+
Kinnise pudeli katse	Respiromeetria: lahustunud hapnik	+/-	+	+
MITI katse	Respiromeetria: hapniku tarbimine	+	+/-	+

Saadud tulemuste tõlgendamisel on vaja andmeid katsematerjali puhtusastme või põhikomponentide osakaalu kohta, eriti kui tulemused on väikesed või piiripealsed.

Andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta bakteritele (IV liide) võivad olla sobivate katsekonsentratsioonide valikul väga kasulikud ja madalate biolagunduvuse väärtuste õigel tõlgendamisel hädavajalikud.

I.3. VÕRDLUSAINED

Töövõtete kontrollimiseks tehakse koos tavaliste katsetega sobivas kolvis paralleelkatse kohese biolagunduvuse kriteeriumidele vastavate võrdlusainetega.

Sobivad võrdlusained on aniliin (värskest destilleeritud), naatriumatsetaat ja naatriumbensoaat. Võrdlusained lagunevad nende meetodite puhul isegi ilma otseselt inokulaati lisamata.

On tehtud ettepanekuid bioloogiliselt kergesti laguneva, kuid inokulaadi lisamist nõudva võrdlusaine otsimiseks. Välja on pakutud kaaliumvesinikftalaati, kuid enne selle aine võrdlusainena tunnustamist tuleb selle kohta rohkem andmeid koguda.

Respiromeetrites katsetes võivad lämmastikku sisaldavad ühendid nitrifikatsiooni kaudu mõjutada hapniku tarbimist (vt II ja V liidet).

I.4. KATSEMEETODITE PÕHIMÕTE

Testaine lahus või suspensioon mineraalses toitelahuses inokuleeritakse ja seda inkubeeritakse aeroobsetes tingimustes pimedas või hajutatud valguse käes. Inokulaadist pärit DOC kogus katselahuses tuleks testainest pärit DOC kogusega võrreldes hoida võimalikult madal. Et arvestada endogeenset aktiivsust inokulaadis, tehakse paralleelne pimekatse inokulaadiga ja ilma testaineta, ehkki endogeenne aktiivsus rakkudes testaine juuresolekul ei ole täpselt identne endogeense kontrollproovi omaga. Töövõtete toimimise kontrolliks tehakse paralleelkatse võrdlusainega.

▼B

Üldjuhul jälgitakse lagundamisprotsessi mitmesuguste parameetrite, nagu DOC, CO₂ eraldumise ja hapniku tarbimise põhjal ja mõõtmisi tehakse nii sageli, et see võimaldab määrata biolagundamise algust ja lõppu. Automaatsete respiromeetrite kasutamisel toimub mõõtmine pidevalt. Lisaks mingile muule parameetrile mõõdetakse vahel DOC-d, kuid tavaliselt tehakse seda ainult katse alguses ja lõpus. Kasutada võib ka spetsiifilist keemilist analüüsi testaine esmase lagunemise ja mis tahes tekkinud vaheühendite kontsentratsiooni määramiseks (nõutav MITI katses).

Üldjuhul on katse pikkus 28 päeva. Katsed võib siiski lõpetada enne 28 päeva möödumist, st kohe, kui biolagundamise graafik on jõudnud platooni ja jäänud sinna vähemalt kolmeks mõõtmiseks. Katseid võib pikendada ka pikemaks kui 28 päeva, kui graafik näitab, et biolagundamine on alanud, kuid platooni ei ole 28 päeva jooksul jõutud.

I.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

I.5.1. Reproduktseeritavus

Biodegradatsiooni ja inokulaadina kasutatud bakteripopulatsioonide iseloomu tõttu tuleks kõiki määramisi teha vähemalt kahe paralleelina.

Kogemus näitab, et mida suurem on katsekeskkonda lisatud mikroorganismide kontsentratsioon, seda väiksemad on korduskatsete vahelised erinevused. Laboritevahelised võrdlused on näidanud ka seda, et eri laborites saadud tulemused võivad erineda üsna palju, kuid tavaliselt saadakse hea biolagunduvusega ühendite puhul üsna sarnased tulemused.

I.5.2. Katse kehtivus

Katse loetakse kehtivaks, kui uuritava kemikaali kõrvaldamisparameetri kordusväärtuste suurim erinevus platoonil ja katse lõpus või kümnepäevase akna lõpus on väiksem kui 20 % ja kui võrdlusaine protsentuaalne lagunemine on 14 päeva jooksul jõudnud kohese biolagunduvuse määraneni. Kui kas või üks neist tingimustest ei ole täidetud, tuleb katset korrata. Meetodite piiratud tõttu ei tähenda madalad väärtused tingimata seda, et testaine keskkonnas bioloogiliselt ei lagune, küll aga seda, et biolagunduvuse määramine nõuab rohkem tööd.

Kui lagunemise määr on testaine ja võrdlusainega mürgisuse katses 14 päeva jooksul alla 35 % (DOC järgi) või alla 25 % (ThOD või ThCO₂ järgi), võib testaine lugeda bioloogilisi protsesse pidurdavaks (vt ka IV liidet). Katseseeriat tuleks korrata, võimaluse korral uuritava kemikaali madalama kontsentratsiooni ja/või inokulaadi kõrgema kontsentratsiooniga, kuid mitte rohkem kui 30 mg tahkeid aineid/liitris.

I.6. ÜLDISED TÖÖMEETODID JA ETTEVALMISTUSED

Katsete puhul kehtivad üldnõuded on kokku võetud tabelis 2. Konkreetsetel üksikute katsetega seotud seadmeid ja katsetingimusi kirjeldatakse hiljem, vastava katse alapunktis.



Tabel 2

Katsetingimused

Katse	DOC kõrvaldamine	CO ₂ eraldumine	Manomeetiline respiromeetria	Muudetud OECD sõelkatse	Kinnise pudeli katse	MITI (l)
Testaine kontsentratsioon						
mg/l			100		2–10	100
mg DOC/l	10–40	10–20	10–40	10–40		
mg ThOD/l			50–100		5–10	
Inokulaadi kontsentratsioon (rakudes/l, ligikaudne)	≤ 30 mg/l hõljumit või ≤ 100 ml reovett/l (10 ⁷ –10 ⁸)			0,5 ml töödeldud reovett/l (10 ⁵)	≤ 5 ml reovett/l (10 ⁴ –10 ⁶)	30 mg/l hõljumit (10 ⁷ –10 ⁸)
Elementide kontsentratsioonid mineraalses toitelahuses (mg/l)						
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					eelistatavalt 7,0
Temperatuur	22 ± 2 °C					25 ± 1 °C

DOC = lahustunud orgaaniline süsinik

ThOD = lahustunud orgaaniline süsinik

SS = hõljuvaine

I.6.1. Lahjendusvesi

Kasutatakse deioniseeritud või destilleeritud vett, mis ei sisalda inhibeerivates kontsentratsioonides mürgiseid aineid (nt Cu⁺⁺ ioone). Orgaanilise süsiniku sisaldus ei tohi olla suurem kui 10 % testainest tulenevast orgaanilise süsiniku sisaldusest. Vee kõrge puhtusaste aitab välistada kõrgete tulemuste saamise nullproovidega. Saastus võib tuleneda nii testaines olevatest lisanditest kui kaioonvahetusvaikudest ja lüüsunud bakteri- või vetikamaterjalist. Igas katseseerias tuleb kasutada ainult samast partiist pärit vett, millele on eelnevalt tehtud DOC analüüs. Kinnise pudeli katses selline analüüs vajalik ei ole, kuid vee hapnikutarve peab olema madal.

▼B**I.6.2. Mineraalainete põhilahused**

Katselahuste jaoks valmistatakse sobivate mineraalainete kontsentratsioonidega põhilahused. Järgmised põhilahused sobivad (erinevaid lahjendusastmeid kasutades) DOC kõrvaldamise katse, muudetud OECD sõelkatse, CO₂ eraldumise katse, manomeetrilise respirometria katse ja kinnise pudeli katse jaoks.

Lahjendusastmed ja MITI katse mineraalse toitelahuse valmistamishüend on esitatud vastavate katsete alapunktides.

Põhilahused

Analüüsipuhastest reaktiividest valmistatakse järgmised põhilahused.

- | | | |
|----|---|---------|
| a) | Kaaliumdivesinikfosfaat, KH ₂ PO ₄ | 8,50 g |
| | Dikaaliumvesinikfosfaat, K ₂ HPO ₄ | 21,75 g |
| | Dinaatriumvesinikfosfaatdihüdraat, Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O | 33,40 g |
| | Ammooniumkloriid, NH ₄ Cl | 0,50 g |
| | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini.
Lahuse pH peaks olema 7,4. | |
| b) | Kaltsiumkloriid, veevaba, CaCl ₂ | 27,50 g |
| | või kaltsiumkloriidihüdraat, CaCl ₂ × 2 H ₂ O | 36,40 g |
| | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini | |
| c) | Magneesiumsulfaatheptahüdraat, MgSO ₄ × 7 H ₂ O | 22,50 g |
| | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini | |
| d) | Raud(III)kloriidheksahüdraat, FeCl ₃ × 6 H ₂ O | 0,25 g |
| | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini. | |

Märkus. Vältimaks vajadust valmistada lahus vahetult enne kasutamist, tuleb neile 1 liitri kohta lisada üks tilk konts. vesinikkloriidhapet või 0,4 g etüleendiamiintetraäädikhappe dinaatriumsoola.

I.6.3. Kemikaalide põhilahused

Juhul kui aine lahustuvus ületab 1 g/l, lahustada vastavalt vajadusele 1–10 g test- või võrdlusainet deioniseeritud vees ja täiendada veega 1 liitrini. Teise võimalusena võib valmistada põhilahuse mineraalses toitelahuses või lisada kemikaali otse mineraalsele toitelahusele. Halvemini lahustuvate kemikaalide käsitlemist vt 3. liitest, kuid MITI katses (meetod C.4-F) ei tohi kasutada ei lahusteid ega emulgaatoreid.

▼B**1.6.4. Inokulaadid**

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda, (klooritamata) reovett, pinnavett või mulda või nende segu. DOC kõrvaldamise, CO₂ eraldumise või manomeetrilise respirometria katses aktiivmuda kasutamisel peaks see olema pärit valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõodus seadmest. Teistest allikatest pärit inokulaatide puhul on ilmnunud tulemuste suurem hajuvus. Muudetud OECD sõelkatse ja kinnise pudeli katse jaoks on vaja lahjemat, mudahelvesteta inokulaati, eelistatav allikas on valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõodus seadmest väljuv töödeldud reovesi. MITI katse inokulaat valmistatakse mitmete lähtematerjalide segust ja vastav kirjeldus on esitatud konkreetse katse alapunktis.

1.6.4.1. Aktiivmudast saadud inokulaat

Proov võetakse valdavalt olmereovett töötleva puhastusjaama või laborimõodus seadme aeratsioonibasseini värskest aktiivmudast. Vajaduse korral eemaldatakse peene sõelaga filtrimisel jämedad osakesed ja hoitakse muda seejärel aeroobsena.

Teine võimalus on muda pärast jämedate osakeste eemaldamist setitada või tseentrifuugida (näiteks 1 100 g 10 min). Kõrvaldatakse supernatant. Muda võib pesta mineraalse toitelahusega. Kontsentreeritud muda suspendeeritakse mineraalses toitelahuses kontsentratsioonil 3–5 g hõljumit/l ja aereeritakse tarvitamiseni.

Muda tuleks võtta tavapärasest, töökorras puhastusjaamast. Suure koormusega puhastusjaamast pärinevat või inhibiitoreid sisaldada võivat muda tuleks pesta. Pärast põhjalikku segamist resuspendeeritud muda setitatakse või tseentrifuugitakse, kõrvaldatakse supernatant ja resuspendeeritakse muda järgmises koguses mineraalses toitelahuses. Protseduuri korratakse, kuni muda loetakse substraadi liist või inhibiitorist vabaks.

Täielikult resuspendeeritud või töötlemata mudast võetakse vahetult enne kasutamist proov hõljumi kuivmassi määramiseks.

Veel üks võimalus on aktiivmuda homogeniseerida (3–5 g hõljumit/l). Muda töödeldakse keskmisel kiirusel 2 min mehaanilises segistis. Homogeniseeritud muda setitatakse 30 min või vajaduse korral kauem ja dekanteeritakse vedelik, mida kasutatakse inokulaadina kontsentratsioonil 10 ml/l mineraalse toitelahuse kohta.

1.6.4.2. Muud inokulaadiallikad

Inokulaadi võib valmistada valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõodus seadmest väljuvast töödeldud reoveest. Selleks võetakse värske proov, mida hoitakse transportimisel aeroobsena. Mudal lastakse 1 h seista või filtritakse see läbi jämeda filterpaberi ja hoitakse dekanteeritud vedelik või filtraat kuni tarvitamiseni aeroobsena. Sellist inokulaati võib kasutada kuni 100 ml toitelahuse liitri kohta.

▼B

Veel üks võimalik inokulaadiallikas on pinnavesi. Sobivast pinna-veekogust, nt jõest või järvest võetakse proov ja hoitakse seda tarvitamiseks aeroobsena. Vajaduse korral kontseentreeritakse inokulaati filtrimise või tsentrifuugimise teel.

1.6.5. Inokulaatide kohandamine

Inokulaate võib lasta kohanduda katsetingimustega, kuid mitte adapteruda uuritava kemikaaliga. Kohandamine seisneb aktiivmuda aeratsioonis mineraalses toitelahuses või töödeldud reeves katsetemperatuuril 5–7 päeva jooksul. Mõnikord parandab kohandamine katsemeetodite täpsust, vähendades nullproovidega saadavaid tulemusi. MITI inokulaadi kohandamist ei peeta vajalikuks.

1.6.6. Abiootilised kontrollproovid

Vajaduse korral kontrollitakse testaine võimalikku abiootilist lagunemist, uurides DOC kõrvaldamist, hapniku tarbimist või süsinikdioksiidi eraldumist steriilsetes inokulaadita kontrollproovides. Proov steriliseeritakse filtrimisel läbi membraani (0,2–0,45 µm) või sobiva mürkaine lisamisega vajalikus kontsentratsioonis. Membraanfiltratsiooni kasutamisel võetakse proovid steriilsuse tagamiseks aseptiliselt. Kui uuritava kemikaali adsorbeerumine ei ole eelnevalt välisatud, tuleb katsetes, kus biolagundumist mõõdetakse DOC kõrvaldamise järgi, eriti aktiivmuda-inokulaatide kasutamisel, kasutada inokuleeritavat ja mürgitavat abiootilist kontrollproovi.

1.6.7. Kolbide arv

Kolbide arv tüüpilises katses on ära toodud iga katse alapunktis.

Kasutada võib järgmisi kombinatsioone:

- katsesuspensioon: sisaldab testainet ja inokulaati;
- inokulaadi nullproov: sisaldab ainult inokulaati;
- protseduuri kontrollproov: sisaldab võrdlusainet ja inokulaati;
- abiootiline steriilne kontrollproov: steriilne, sisaldab testainet (vt I.6.6);
- adsorptsiooni kontrollproov: sisaldab testainet, inokulaati ja steriliseerivat ainet;
- mürgisuse kontrollproov: sisaldab testainet, võrdlusainet ja inokulaati.

Paralleelmõõtmised katsesuspensiooni ja inokulaadi nullprooviga on kohustuslikud. Soovitav on teha mõõtmised ka ülejäänud paralleelidega.

See ei pruugi aga alati võimalik olla. Tagada tuleb küllaldane proovide või mõõtmiste arv protsentuaalse kõrvaldamise leidmiseks 10-päevase akna kestel.

▼B

I.7. ANDMED JA HINDAMINE

Protsentuaalse lagunemise (D_t) arvutamisel kasutatakse nii katseanuma kui ka inokulaadi nullproovi kordumõõtmiste keskmisi. Vastavad valemid on sätestatud allpool, konkreetsetele katsetele vastavates alapunktides. Lagunemise käik esitatakse graafiliselt ja näidatakse ära kümnapäevane aken. Tuleks arvutada ja esitada kõrvaldamisprotsent kümnapäevase akna lõpus ja väärtus platool või katse lõpus, vastavalt vajadusele.

Respiromeetrilistes katsetes võivad lämmastikku sisaldavad ühendid nitrifikatsiooni kaudu mõjutada hapniku tarbimist (vt II ja V liidet).

I.7.1. **DOC määramise põhjal mõõdetud lagunemine**

Katse kehtivuse hindamiseks tuleks testainet sisaldavate kolbide kohta eraldi arvutada protsentuaalne lagunemine (D_t) igal proovi võtmise hetkel, kasutades DOC topelmõõtmiste keskmisi väärtusi (vt I.5.2). See arvutatakse järgmise võrrandi abil:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100$$

kus:

D_t = lagunemisprotsent ajahetkel t ,

C_o = DOC keskmine algkontsentratsioon testainet sisaldavas inokuleeritud toitelahuses (mg DOC/l),

C_t = DOC keskmine kontsentratsioon testainet sisaldavas inokuleeritud toitelahuses ajahetkel t (mg DOC/l),

C_{bo} = DOC keskmine algkontsentratsioon substraadivabas inokuleeritud mineraalses toitelahuses (mg DOC/l),

C_{bt} = DOC keskmine kontsentratsioon substraadivabas inokuleeritud mineraalses toitelahuses ajahetkel t (mg DOC/l).

Kõik kontsentratsioonid määratakse katseliselt.

I.7.2. **Spetsiifilise analüüsi põhjal mõõdetud lagunemine**

Kui on olemas spetsiifilise analüüsi andmed, arvutatakse esmane biolagunemine valemist:

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

kus:

D_t = lagunemisprotsent ajahetkel t , üldjuhul 28 päeva möödumisel,

S_a = testaine jääk inokuleeritud toitelahuses katse lõpul (mg),

S_b = testaine jääk pimekatses vee/toitelahusega, kuhu on lisatud ainult testaine (mg).

▼B1.7.3. **Abiootiline lagunemine**

Abiootilise steriilse kontrollproovi kasutamisel arvutatakse protsentuaalne abiootiline lagunemine valemist:

$$\text{protsentuaalneabiootiline} \text{lagunemine} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

kus

$C_{s(0)}$ = DOC kontsentratsioon steriilses kontrollproovis 0-päeval,

$C_{s(t)}$ = DOC kontsentratsioon steriilses kontrollproovis päeval t.

I.8. **ARUANDLUS**

Katsearuanne sisaldab võimaluse korral järgmisi andmeid:

- test- ja võrdlusaineid ning nende puhtusastet;
- katsetingimusi;
- inokulaadi kohta: tüüpi ja päritolu, kontsentratsiooni ja kohandamist, kui seda kasutati;
- tööstuslike heitmete osakaalu ja iseloomu reovees, kui see on teada;
- katse kestust ja temperatuuri;
- vahelahustuvate testainete puhul nende käsitlemise meetodeid;
- kasutatud katsemeetodit; meetodi mis tahes muudatusi tuleb teaduslikult põhjendada ja seletada;
- andmeid;
- kõiki täheldatud inhibitsiooninähte;
- abiootilist lagunemist, kui seda täheldati;
- spetsiifilise keemilise analüüsi andmeid, kui neid on;
- vaheühendite analüüsiandmeid, kui neid analüüsiti;
- test- ja võrdlusainete protsentuaalse lagunemise graafikut ajas; selgelt tuleks näidata ootefaas, lagunemisfaas, kümnapäevane aken ja tõus (1. liide). Kui katse vastab kvaliteedinõuetele, võib graafikul kasutada testainet sisaldavate kolbide lagunemisprotsentide keskmist väärtust;
- lagunemisprotsenti kümnapäevase akna lõpus ja platool või katse lõpus.

II OSA **DOC KÕRVALDAMISE KATSE** (meetod C.4-A)II.1. **PÕHIMÕTE**

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (10–40 mg DOC/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, aereeritakse pimedas või hajutatud valguse käes 22 ± 2 °C juures.

▼B

Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul sagedaste DOC analüüsidega. Arvutatakse biolagundumise määr, väljendades kõrvaldatud DOC kontsentratsiooni (mida on parandatud inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) protsendina algkontsentratsioonist. Esmase biolagundumise määra võib arvutada ka inkubeerimise algul tehtud täiendava keemilise analüüsi põhjal.

II.2. MEETODI KIRJELDUS

II.2.1. Seade

- a) koonilised kolvid, mahuga nt 250 ml kuni 2 l, olenevalt DOC analüüsiks vajalikust mahust;
- b) kooniliste kolvide loksutusseade, mis on termostateeritud või asub püsiva temperatuuriga ruumis ja on piisava võimsusega aeroobsete tingimuste tagamiseks kõigis kolvides;
- c) sobivate membraanidega filtrimisseade;
- d) DOC analüsaator;
- e) lahustunud hapniku määramise seade;
- f) tsentrifuug.

II.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 800 ml lahendusveega, liidetakse 1 ml lahuseid b kuni d ja täiendatakse veega 1 liitrini.

II.2.3. Inokulaadi valmistamine ja kohandamine

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda; reovett; pinnavett või mulda või nende segu.

Vt punkte I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

II.2.4. Kolvide ettevalmistamine

Näiteks viiakse 800 ml kogused mineraalset toitelahust 2 l koonilistesse kolvidesse ning lisatakse eri kolvidesse küllaldased kogused test- ja võrdlusainete põhilahuseid, nii et saadakse keemilise kontsentratsiooniga, mis vastab 10–40 mg DOC-ile liitris. Kontrollitakse pH väärtusi ja viiakse need vajaduse korral 7,4ni. Kolvid inokuleeritakse aktiivmuda või muud päritolu inokulaadiga (vt I.6.4), lõpliku hõljumi kontsentratsiooniga kuni 30 mg/l. Valmistatakse ka inokulaadi kontrollproovid mineraalse toitelahusega, kuid ilma test- või võrdlusaineta.

Vajaduse korral kontrollitakse ühes kolvis testaine võimalikku inhibeerivat mõju, inokuleerides võrreldavate kontsentratsioonidega test- ja võrdlusaine lahuse mineraalses toitelahuses.

Vajaduse korral kontrollitakse veel ühes steriilses kolvis testaine abiootilist lagunemist, kasutades aine inokuleerimata lahust (vt I.6.6).

▼B

Kui arvatakse, et testaine võib olulisel määral adsorbeeruda klaasil, mudal jne, tehakse eelkatse, kus hinnatakse adsorptsiooni tõenäolist ulatust ja seega ka katse sobivust antud ainele (vt tabelit 1). Selleks valmistatakse ette kolb testaine, inokulaadi ja steriliseeriva ainega.

Lahused kõigis kolbides täiendatakse mineraalse toitelahusega 1 liitri ja võetakse pärast segamist igast kolvist DOC algkontsentratsiooni määramiseks proov (vt II.4 liide). Kolbide avad kaetakse nt alumiiniumfooliumiga nii, et see ei takista õhu vaba liikumist kolvi ja ümbritseva atmosfääri vahel. Seejärel asetatakse kolvid katse alustamiseks loksutisse.

II.2.5. Kolbide arv tüüpilises katses

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon.

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov.

Kolb 5: protseduuri kontrollproov.

Eelistatavalt ja vajaduse korral:

kolb 6: abiootiline steriilne kontrollproov,

kolb 7: adsorptsiooni kontrollproov,

kolb 8: mürgisuse kontrollproov.

Vt ka punkti I.6.7.

II.2.6. Katse tegemine

Kogu katse kestel määratakse igas kolvis kindlate ajavahemike järel DOC kontsentratsioon, piisava sagedusega kümnapäevase akna alguse määramiseks ja protsentuaalse kõrvaldamise määramiseks kümnapäevase akna lõpus. Igaks määramiseks võetakse ainult minimaalne vajalik kogus katsesuspensiooni.

Enne proovide võtmist korvatakse vajaduse korral aurustumiskaod kolbides vajaliku koguse lahjendusvee lisamisega (I.6.1). Segu segatakse enne proovi võtmist hoolikalt ja veendutakse, et nõu seintele sadestunud materjal enne proovi võtmist lahustub või suspendeerub. Kohe pärast võtmist proovid membraan-filtreeritakse või tsentrifuugitakse (vt II.4 liidet). Filtritud või tsentrifuugitud proovid analüüsitakse samal päeval või säilitatakse 2–4 °C juures kuni 48 tundi või pikaajalisemal säilitamisel alla –18 °C juures.

II.3. ANDMED JA ARUANDLUS**II.3.1. Tulemuste käsitlemine**

Protsentuaalne lagunemine ajahetkel t arvutatakse punktis I.7.1 (DOC määramine) ja vajaduse korral ka punktis 1.7.2 (spetsiifiline analüüs) kirjeldatud moel.

Kõik tulemused esitatakse etteantud andmetabelis.

▼BII.3.2. **Tulemuste kehtivus**

Vt punkti I.5.2.

II.3.3. **Aruandlus**

Vt punkti I.8.

II.4. **ANDMETABEL**

Järgneb andmetabeli näide.

DOC KÕRVALDAMISE KATSE

1. **LABOR**2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV**3. **TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Algkontsentratsioon toitelahuses, t_0 : ... (kemikaali sisaldus, mg/l)4. **INOKULAAT**

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus: ... mg/l

5. **SÜSINIKU MÄÄRAMINE**

Süsinikuanalüsaator:

	Kolvi nr		DOC n päeva pärast (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testaine koos inokulaadiga	1	a_1					
		a_2					
		a, keskmine $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, keskmine $C_{b(t)}$					

▼ **B**

	Kolvi nr		DOC n päeva pärast (mg/l)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
Inokulaadi null- proovid testaineta	3	C ₁					
		C ₂					
		c, keskmine C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		d, keskmine C _{d(t)}					
		$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$					

6. TÖÖTLEMATA ANDMETE HINDAMINE

Kolvi nr		Lagunemisprotsent in päeva möödumisel				
		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				
Keskmine ⁽¹⁾	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

⁽¹⁾ D₁ ja D₂ ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

Märkus. Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

7. ABIOOTILINE KONTROLLPROOV (pole kohustuslik)

	Aeg (päevades)	
	0	t
DOC konts. steriilses kontrollproovis (mg/l)	C _{s(o)}	C _{s(t)}

$$\text{protsentuaalne abiootiline lagunemine} = \frac{C_{s(o)} - C_{s(t)}}{C_{s(o)}} \times 100$$

8. SPETSIIFILINE KEEMILINE ANALÜÜS (pole kohustuslik)

	Testaine jääk katse lõpus (mg/l)	Esmase lagunemise %
Steriilne kontrollproov	S _b	

▼B

	Testaine jääk katse lõpus (mg/l)	Esmase lagunemise %
Inokuleeritud toitelahus	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

III OSA MUUDETUD OECD SÕELKATSE (meetod C.4-B)**III.1. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (10–40 mg DOC/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, inokuleeritakse 0,5 ml reoveega liitri lahuse kohta. Seejärel aereeritakse segu pimedas või hajutatud valguse käes 22 ± 2 °C juures.

Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul sagedaste DOC analüüsides. Arvutatakse biolagundumise määr, väljendades kõrvaldatud DOC kontsentratsiooni (mida on parandatud inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) protsendina algkontsentratsioonist. Esmase biolagundumise määra võib arvutada ka inkubeerimise algul ja lõpul tehtud täiendava keemilise analüüsi põhjal.

III.2. MEETODI KIRJELDUS**III.2.1. Seadmed:**

- a) koonilised kolvid, mahuga nt 250 ml kuni 2 l, olenevalt DOC analüüsiks vajalikust mahust;
- b) kooniliste kolvide loksutusseade, mis on termostateeritud või asub püsiva temperatuuriga ruumis ja on piisava võimsusega aeroobsete tingimuste tagamiseks kõigis kolvides;
- c) sobivate membraanidega filtrimisseade;
- d) DOC analüsaator;
- e) lahustunud hapniku määramise seade;
- f) tsentrifuug.

III.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 80 ml lahjendusveega, lisatakse 1 ml lahuseid b–d ja täiendatakse veega 1 liitri.

Selles meetodis kasutatakse ainult 0,5 ml inokulaati liitri kohta, mistõttu võib olla vaja lisada toitelahusele mikroelemente ja kasvatageid. Selleks lisatakse liitri lõpliku toitelahuse kohta 1 ml igast järgmisest lahusest:

▼B

Mikroelementide lahus:

Mangaansulfaattetraahüdraat, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	39,9 mg
Boorhape, H_3BO_3	57,2 mg
Tsinksulfaatheptahüdraat, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	42,8 mg
Ammooniumheptamolüüdaat, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	34,7 mg
Fe-kelaat (FeCl_3 -etüleendiamiintetraäädikhape)	100,0 mg

Lahustatakse vees ja täiendatakse lahjendusveega 1 000 ml-ni.

Vitamiinilahus:

pärmiekstrakt	15,0 mg
---------------	---------

Pärmiekstrakt lahustatakse 100 ml vees. Lahus steriliseeritakse filtrimisel läbi 0,2 μm membraani või valmistatakse vahetult enne kasutamist.

III.2.3. Inokulaadi valmistamine ja kohandamine

Inokulaadi võib valmistada valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadmest väljuvast töödeldud reoveest. Vt punkte I.6.4.2 ja I.6.5.

Kasutatav kogus on 0,5 ml ühe liitri mineraalse toitelahuse kohta.

III.2.4. Kolbide ettevalmistamine

Näiteks viiakse 800 ml kogused mineraalset toitelahust 2 l koonilistesse kolbidesse ning lisatakse eri kolbidesse küllaldased kogused test- ja võrdlusainete põhilahuseid, nii et saadakse kemikaalikoostsentsioon, mis vastab 10–40 mg DOC-ile liitris. Kontrollitakse pH väärtust ja viiakse see vajaduse korral 7,4ni. Kolvid inokuleeritakse 0,5 ml reovee lisamisega liitri kohta (vt I.6.4.2). Valmistatakse ka inokulaadi kontrollproovid mineraalse toitelahusega, kuid ilma test- või võrdlusaineta.

Vajaduse korral kontrollitakse ühes kolvis testaine võimalikku inhibeerivat mõju, inokuleerides võrreldavate kontsentratsioonidega test- ja võrdlusaine lahuse mineraalses toitelahuses.

Vajaduse korral kontrollitakse veel ühes steriilses kolvis testaine abiootilist lagunemist, kasutades aine inokuleerimata lahust (vt I.6.6).

Kui arvatakse, et testaine võib olulisel määral adsorbeeruda klaasil, mudal jne, tehakse eelkatse, kus hinnatakse adsorptsiooni tõenäolist ulatust ja seega ka katse sobivust antud ainele (vt tabelit 1). Selleks valmistatakse ette kolb testaine, inokulaadi ja steriliseeriva ainega.

Lahused kõigis kolbides täiendatakse mineraalse toitelahusega 1 liitri ja võetakse pärast segamist igast kolvist DOC algkontsentratsiooni määramiseks proov (vt II.4 liidet). Kolbide avad kaetakse näiteks alumiiniumfooliumiga nii, et see ei takista õhu vaba liikumist kolvi ja ümbritseva atmosfääri vahel. Seejärel asetatakse kolvid katse alustamiseks loksutisse.

▼B**III.2.5. Kolbide arv tüüpilises katses**

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon.

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov.

Kolb 5: protseduuri kontrollproov.

Eelistatavalt ja vajaduse korral

kolb 6: abiootiline steriilne kontrollproov,

kolb 7: adsorptsiooni kontrollproov,

kolb 8: mürgisuse kontrollproov.

Vt ka punkti I.6.7.

III.2.6. Katse tegemine

Kogu katse kestel määratakse igas kolvis kindlate ajavahemike järel DOC kontsentratsioon piisava sagedusega kümnepäevase akna alguse määramiseks ja protsentuaalse kõrvaldamise määramiseks kümnepäevase akna lõpus. Igaks määramiseks võetakse ainult minimaalne vajalik kogus katsesuspensiooni.

Enne proovide võtmist korvatakse vajaduse korral aurustumiskaod kolvides vajaliku koguse lahjendusvee lisamisega (I.6.1). Segu segatakse enne proovi võtmist hoolikalt ja veendutakse, et nõu seintele sadestunud materjal enne proovi võtmist lahustub või suspendeerub. Kohe pärast võtmist proovid membraan-filtreeritakse või tsentrifuugitakse (vt II.4 liidet). Filtritud või tsentrifuugitud proovid analüüsitakse samal päeval või säilitatakse 2–4 °C juures kuni 48 tundi või pikaajalisemal säilitamisel alla –18 °C juures.

III.3. ANDMED JA ARUANDLUS**III.3.1. Tulemuste käsitlemine**

Protsentuaalne lagunemine ajahetkel t arvutatakse punktis I.7.1 (DOC määramine) ja vajaduse korral ka punktis I.7.2 (spetsiifiline analüüs) kirjeldatud moel.

Kõik tulemused esitatakse etteantud andmetabelis.

III.3.2. Tulemuste kehtivus

Vt punkti I.5.2.

III.3.3. Aruandlus

Vt punkti I.8.

III.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

MUDETUD OECD SÕELKATSE**1. LABOR****2. KATSE ALGUSKUUPÄEV**

▼B**3. TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Algkontsentratsioon toitelahuses, t_0 : ... (kemikaali sisaldus, mg/l)**4. INOKULAAT**

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus: ... mg/l

5. SÜSINIKU MÄÄRAMINE

Süsinikuanalüsaator:

	Kolvi nr		DOC n päeva möödumisel (mg/l)				
			0	n_1	n_2	n_3	n_x
Testaine koos inokulaadiga	1	a_1					
		a_2					
		a, keskmine $C_{a(t)}$					
	2	b_1					
		b_2					
		b, keskmine $C_{b(t)}$					
Inokulaadi null- proovid testaineta	3	C_1					
		C_2					
		c, keskmine $C_{c(t)}$					
	4	d_1					
		d_2					
		d, keskmine $C_{d(t)}$					
	$C_{bl(t)} = \frac{C_{c(t)} + C_{d(t)}}{2}$						

6. TÖÖTLEMATA ANDMETE HINDAMINE

Kolvi nr		Laguremisprotsent n päeva pärast				
		0	n_1	n_2	n_3	n_x
1	$D_1 = \left(1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0				

▼B

Kolvi nr		Laguremisprotsent n päeva pärast				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
2	$D_2 = \left(1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}}\right) \times 100$	0				
Keskmine (*)	$D = \frac{D_1 - D_2}{2}$	0				

(*) D₁ ja D₂ ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

Märkus. Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

7. ABIOOTILINE KONTROLLPROOV (pole kohustuslik)

	Aeg (päevades)	
	0	t
DOC konts. steriilses kontrollproovis (mg/l)	C _{S(0)}	C _{S(t)}

$$\text{Protsentuaalne abiootiline lagunemine} = \frac{C_{S(0)} - C_{S(t)}}{C_{S(0)}} \times 100$$

8. SPETSIIFILINE KEEMILINE ANALÜÜS (pole kohustuslik)

	Testaine jääk katse lõpus	Esmase lagunemise %
Steriilne kontrollproov	S _b	
Inokuleeritud toitelahus	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

IV OSA CO₂ ERALDUMISE KATSE (meetod C.4-C)

IV.1. PÕHIMÕTE

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (10–20 mg DOC/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, aereeritakse süsinikdioksiidivaba õhu läbipuhumisega kindlal kiirusel pimedas või hajutatud valguse käes. Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul eralduva CO₂ määramise abil, viimane püütakse baarium- või naatriumhüdroksiidi ja mõõdetakse hüdroksiidi jäägi tiitrimise või anorgaanilise süsiniku määramise teel. Testainest tekkiv süsinikdioksiidi kogus (mida on parandatud inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) väljendatakse protsendina ThCO₂-st. Biolagundumise määra võib arvutada ka inkubeerimise algul tehtud täiendava DOC analüüsi põhjal.

▼B

IV.2. KATSEMEETODI KIRJELDUS

IV.2.1. Seadmed

- a) 2–5liitrised kolvid peaaegu põhjani ulatava aeratsioonitoru ja väljaviiguga;
- b) vähelahustuvate ainete uurimisel magnetsegajad;
- c) gaasipüüdurpudelid;
- d) õhuvoolu reguleerimise ja mõõtmise seade;
- e) seade süsinikdioksiidi väljapesemiseks süsinikdioksiidivaba õhu valmistamiseks; teise võimalusena võib kasutada õiges vahekorras segu (20 % O₂: 80 % N₂) CO₂-vabast balloonihapnikust ja CO₂-vabast ballooniämmastikust;
- f) seade süsinikdioksiidi määramiseks kas tiitrimetriselt või mis tahes põhimõttel töötava anorgaanilise süsiniku analüsaatori abil;
- g) membraanfiltratsiooniseade (ei ole kohustuslik);
- h) DOC analüsaator (ei ole kohustuslik).

IV.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 800 ml lahendusveega, lisatakse 1 ml lahuseid b kuni d ja täiendatakse veega 1 liitri.

IV.2.3. Inokulaadi valmistamine ja kohandamine

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda, reovett, pinnavett või mulda või nende segu.

Vt punkte I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

IV.2.4. Kolbide ettevalmistamine

Järgmises näites on esitatud mahulised kogused ja kaalutised viieliitriste kolbide jaoks 3 l suspensiooniga. Väiksemate koguste kasutamisel võib koguseid vastavalt muuta, kuid tagada tuleb täpseks mõõtmiseks piisav süsinikdioksiidi eraldumine.

Igasse viieliitrisesse kolbi lisatakse 2 400 ml mineraalset toitelahust. Seejärel lisatakse sobiv kogus ettevalmistatud aktiivmuda (vt I.6.4.1 ja I.6.5) nii, et hõljumi kontsentratsioon lõplikus 3 liitris inokuleeritud segus ei ületa 30 mg/l. Teise võimalusena võib ettevalmistatud muda kõigepealt lahjendada mineraalse toitelahusega nii, et saadakse suspensioon kontsentratsiooniga 500 – 1 000 mg/l, misjärel lisatakse sellest kindel kogus viieliitrisesse kolbi nii, et saadakse lõppkontsentratsioon 30 mg/l; nõnda tagatakse suurem täpsus. Kasutada võib muid inokulaadiallikaid (vt I.6.4.2).

Inokuleeritud segusid aereeritakse üleöö CO₂-vaba õhuga, et puhastada süsteem süsinikdioksiidist.

▼B

Eraldi paralleelkolbidele lisatakse kindla koguse põhilahuse näol test- ja võrdlusaine nii, et neist tulenev DOC või TOC kontsentratsioon on 10–20 mg/l; mõned kolvid jäetakse kemikaalita inokulaadi kontrollproovideks. Vähelahustuvad testained lisatakse massi või mahu järgi otse kolbi või neid käsitletakse 3. liites kirjeldatud moel.

Vajaduse korral kontrollitakse ühes kolvis testaine võimalikku inhibeerivat mõju, lisades kolbi ülejäänud kolbidega võrdses kontsentratsioonis nii test- kui ka võrdlusainet.

Vajaduse korral kontrollitakse veel ühes steriilses kolvis testaine abiootilist lagunemist, kasutades aine inokuleerimata lahust (vt I.6.6). Proov steriliseeritakse sobivas kontsentratsioonis mürkaine lisamisega.

Enne seda täiendatakse suspensioonid kõigis kolmes kolvis CO₂-vaba õhuga aereeritud mineraalse toitelahusega 3 liitrini. Lisaks võib võtta proove DOC analüüsiks (vt II.4 liidet) ja/või spetsiifiliseks analüüsiks. Pesupudelid ühendatakse kolbide väljaviiguga.

Baariumhüdroksiidi kasutamisel ühendatakse iga viieliitrise kolviga järjestikku kolm pesupudelit, millest igaüks on 100 ml 0,0125 M baariumhüdroksiidlahust. Lahus ei tohi sisaldada sulfaadi ja karbonaadi sadet ja selle kontsentratsioon tuleb määrata vahetult enne kasutamist. Naatriumhüdroksiidi kasutamisel ühendatakse järjestikku kaks püüdurit, kusjuures teine on kontrollpüüdur, mis peab näitama, kas esimene absorbeeris kogu süsinikdioksiidi. Sobivad ka seerumpudeli sulguriga pesupudelid. Igasse pudelisse lisatakse 200 ml 0,05 M naatriumhüdroksiidi, mis on küllaldane kogu testaine täielikul lagunemisel tekkiva süsinikdioksiidi absorbeerimiseks. Isegi vahetult enne kasutamist valmistatud naatriumhüdroksiidi lahus sisaldab väikestes kogustes karbonaate, vastav viga korrigeeritakse nullproovi karbonaadikoguse lahutamisega.

IV.2.5. **Kolbide arv tüüpilises katses**

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon.

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov.

Kolb 5: protseduuri kontrollproov.

Eelistatavalt ja vajaduse korral:

kolb 6: abiootiline steriilne kontrollproov,

kolb 7: mürgisuse kontrollproov,

kolb 8: mürgisuse kontrollproov.

Vt ka punkti I.6.7.

IV.2.6. **Katse tegemine**

Katset alustatakse CO₂-vaba õhu juhtimisega läbi suspensioonide kiirusega 30–100 ml/min. Süsinikdioksiidi absorbendist võetakse CO₂ sisalduse määramiseks regulaarselt proove. Esimese kümne päeva jooksul on soovitatav teha analüüse iga kahe või kolme päeva tagant, seejärel iga viie päeva tagant kuni 28. päevani, nii et saab määrata kümnepäevase aknaperioodi.

▼B

28. päeval võetakse proovid DOC ja spetsiifilise analüüsi jaoks (kui neid tehakse), mõõdetakse suspensioonide pH ja lisatakse igasse kolbi 1 ml kontsentreeritud vesinikkloriidhapat; kolbe aereeritakse üleöö, et kõrvaldada suspensioonides olev süsinikdioksiid. 29. päeval tehakse viimane eralduva süsinikdioksiidi analüüs.

CO₂ mõõtmise päevadel eemaldatakse kõige kolvipoolsem baariumhüdroksiidiga pesupudel ja tiitritakse hüdroksiidilahust 0,05 M HCl-ga, kasutades indikaatorina fenoolftaleiini. Ülejäänud pesupudelid nihutatakse ühe koha võrra kolvile lähemale ja paigutatakse kauge-masse otsa uus pesupudel 100 ml värske 0,0125 M baariumhüdroksiidiga. Tiitrimisi tehakse kas vastavalt vajadusele, näiteks siis, kui esimeses püüduris täheldatakse märgatavat sadet ja enne sademe teket teises pudelis või vähemalt kord nädalas. NaOH kasutamisel absorbendina võetakse süstlaga väike proov (mille suurus sõltub kasutatavast süsinikuanalüsaatorist) kolvipoolses pesupudelis olevast naatriumhüdroksiidilahusest. Proov süstitakse eraldunud süsinikdioksiidi otseseks määramiseks süsinikuanalüsaatori anorgaanilise süsiniku määrajasse.

Teise püüduri sisu analüüsitakse alles katse lõpus, et vajaduse korral lisada arvutustesse läbikandunud süsinikdioksiidi arvestav parandus.

IV.3. ANDMED JA ARUANDLUS

IV.3.1. Tulemuste käsitlemine

Püüdurisse kogutud CO₂ kogus leitakse tiitrimisel järgmise valemiga järgi:

$$\text{mgCO}_2 = (100 \times C_B - 0,5 \times v \times C_A) \times 44$$

kus:

V = 100 ml absorbeerimislahuse tiitrimiseks kulunud HCl maht (ml),

C_B = baariumhüdroksiidilahuse kontsentratsioon (M),

C_A = vesinikkloriidhappelahuse kontsentratsioon (M),

kui C_B on 0,0125 M ja C_A on 0,05 M, kulub 100 ml baariumhüdroksiidi tiitrimiseks 50 ml lahust ja CO₂ mass leitakse järgmisest valemist:

$$\frac{0,05}{2} \times 44 \times \text{tiitrimiseks kulunud HCl (ml)} = 1,1 \times \text{ml HCl}$$

Seega on teisendustegur tekkinud CO₂ massi (mg) arvutamisel tiitrimisel kulunud HCl mahust (ml) 1,1.

Vastavate tiitrimisandmete põhjal arvutatakse ainult inokulaadist tekkiva CO₂ ning inokulaadi ja testaine segust tekkiva CO₂ massid, nende vahe ongi ainult testainest tekkiva CO₂ mass.

Näiteks kui inokulaadiga kulub tiitrimisele 48 ml ning inokulaadi ja testaine seguga 45 ml,

$$\text{CO}_2 \text{ inokulaadist} = 1,1 \times (50 - 48) = 2,2 \text{ mg}$$

▼B

CO₂ inokulaadi ja testaine segust = 1,1 × (50–45) = 5,5 mg

on testainest tekkiva CO₂ mass 3,3 mg.

Biolagundumise protsent arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{eralduva CO}_2 \text{ mass (mg)} \times 100}{\text{ThCO}_2 \times \text{lisatud testainemass (mg)}}$$

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{eralduva CO}_2 \text{ mass (mg)} \times 100}{\text{katses lisatud TOC(mg)} \times 3,67}$$

kus 3,67 on teisendustegur (44/12) üleminekul süsiniku massilt süsinikdioksiidi massile.

Lagunemisprotsent mis tahes ajavahemiku järel leitakse kõigi mõõtmispäevale eelnevate päevade kohta arvatatud protsentuaalsete ThCO₂ väärtuste liitmisel.

Naatriumhüdroksiidiga absorbeerimisel arvutatakse tekkinud süsinikdioksiidi kogus, väljendatuna anorgaanilise süsinikuna (IC) milligrammides, korrutades IC kontsentratsiooni absorbendis absorbendi mahuga.

Lagunemisprotsent arvutatakse järgmise valemi järgi:

$$\% \text{ of ThCO}_2 = \frac{\text{IC katsekolvi (mg)} - \text{IC nullproovi(mg)}}{\text{Katseainene a lisatud TOC(mg)}} \times 100$$

DOC kõrvaldamise võib arvutada vastavalt punktile I.7. Need ja kõik ülejäänud tulemused registreeritakse etteantud andmetabelis.

IV.3.2. Tulemuste kehtivus

Katseaine – mineraalse toitelahuse suspensiooni anorgaanilise süsiniku sisaldus katse algul peab olema vähem kui 5 % süsiniku üldsisaldusest (TC) ja eraldunud CO₂ summaarne kogus inokulaadiga nullproovi puhul ei tohiks katse lõpul üldjuhul ületada 40 mg/l lahuse kohta. Kui saadavad väärtused on suuremad kui 70 mg CO₂/l, tuleks andmed ja katsetehnika kriitiliselt üle vaadata.

Vt ka punkti I.5.2.

IV.3.3. Aruandlus

Vt punkti I.8.

IV.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

SÜSINIKDIOKSIIDI ERALDUMISE KATSE

1. LABOR

2. KATSE ALGUSKUUPÄEV

3. TESTAINE

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

▼B

Algkonts. toitelahuses: ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Kolbi lisatud süsiniku koguhulk: ...mg C

ThCO₂:...mg CO₂

4. INOKULAAT

Allikas:

Töötlus:

Kohandamine, kui seda tehti:

Hõljumi kontsentratsioon segus: ... mg/l

5. SÜSINIHKDIOKSIIDI ERALDUMINE JA LAGUNDUVUS

Meetod: Ba(OH)₂/NaOH/muu

Aeg (päevades)	Tekkinud CO ₂ Katselahus (mg)		Tekkinud CO ₂ nullproov (mg)		Tekkinud CO ₂ kumu- latiivne (mg) (ja nullproovi vahe keskmise)		ThCO ₂ kumulatiivne $\frac{CO_2}{ThCO_2} \times 100$		
	1 2	keskmise	3 4	keskmise	1	2	1	2	keskmise
0									
n ₁									
n ₂									
n ₃									
28									

Märkus.: Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

5. SÜSINIHKU ANALÜÜS (pole kohustuslik)

Süsinikuanalüsaator:

Aeg (päevades)	Nullproov (mg/l)	Testaine (mg/l)
0	C _{b(o)}	C _o
28 (*)	C _{b(t)}	C _t

(*) või inkubatsiooniperioodi lõpus.

▼B

$$\text{DOC Kõrvaldamisprotsent} = \left(\frac{1 - C_t - C_{b(t)}}{1 - C_t - C_{b(o)}} \right) \times 100$$

7. ABIOTOILISE LAGUNEMISE KATSE (pole kohustuslik)

$$\text{abiotoilise lagunemise \%} = \frac{\text{CO}_2 - \text{CO}_2 \text{ teke steriilses kolvis 28 päeva jarel (mg)}}{\text{ThCO}_2(\text{mg})} \times 100$$

V. OSA MANOMEETRILISE RESPIROMEETRIA KATSE
(meetod C.4-D)**V.1. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Kindlat kogust inokuleeritud mineraalset toitelahust kindla testaine kontsentratsiooniga (100 mg/l testainet, ThOD-ga vähemalt 50–100 mg/l), mis on ainus nominaalne orgaanilise süsiniku allikas, segatakse kuni 28 päeva kinnises kolvis konstantsel temperatuuril (kõikumisega ± 1 °C või alla selle). Hapniku tarbimine määratakse kas konstantse gaasiruumala hoidmiseks vajaliku (elektrolüüsil saadud) hapniku koguse mõõtmisel või ruumala või rõhu (või mõlema) muutuse järgi seadmes. Tekkiv süsinikdioksiid absorbeeritakse kaaliumhüdrosiidi või muu sobiva absorbendi lahuses. Testaine hapnikutarve (mida on parandatud paralleelse inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) väljendatakse protsendina ThOD-st või KHT-st. Lisaks võib inkubeerimise algul ja lõpul tehtud täiendava keemilise analüüsi põhjal arvutada ka esmase biolagundumise määra ja DOC analüüsi põhjal lõpliku biolagundumise määra.

V.2. KATSEMEETODI KIRJELDUS**V.2.1. Seadmed**

- a) sobiv respiromeeter;
- b) termostaat täpsusega ± 1 °C või täpsem;
- c) membraanfiltratsiooni seade (pole kohustuslik);
- d) süsinikuanalüsaator (pole kohustuslik).

V.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

10 ml lahust a segatakse 800 ml lahjendusveega, lisatakse 1 ml lahuseid b kuni d ja täiendatakse veega 1 liitriini.

V.2.3. Inokulaadi valmistamine ja kohandamine

Inokulaadi saamisel võib kasutada mitmeid lähtematerjale: aktiivmuda, reovett, pinnavett ja mulda või nende segu.

Vt punkte I.6.4, I.6.4.1, I.6.4.2 ja I.6.5.

V.2.4. Kolbide ettevalmistamine

Põhilahustest valmistatakse eraldi test- ja võrdlusainete lahused mineraalses toitelahuses, üldjuhul kontsentratsiooniga 100 mg kemikaali/liitris (ThOD-ga vähemalt 50–100 mg/l).

▼B

ThOD arvutatakse ammooniumisoolade moodustumise põhjal, välja arvatud juhul, kui eeldatakse nitrifikatsiooni toimumist, sel juhul eeldatakse arvutustes nitraadi moodustumist (vt II liidet punkti 2).

Kontrollitakse pH väärtusi ja viiakse need vajaduse korral $7,4 \pm 0,2$ ni.

Vähelahustuvad ained tuleks lisada hilisemas faasis (vt allpool).

Testaine mürgisuse kontrollimisel valmistatakse ette veel üks lahus, mis sisaldab üksikute lahustega võrdses kontsentratsioonis nii testkui ka võrdlusainet.

Kui on vaja määrata füüsikalis-keemiline hapnikutarve, valmistatakse testaine lahus ThOD-ga üldjuhul 100 mg/l, mis steriliseeritakse sobiva mürgaine lisamisega (vt I.6.6).

Vähemalt kahtedesse paralleelkolbidesse lisatakse vajalikud kogused test- ja võrdlusainete lahuseid. Täiendavad kolvid valmistatakse ette ainult mineraalse toitelahusega (inokulaadi kontrollproovid) ning vajaduse korral test- ja võrdlusaine seguga ja steriilse lahusega.

Vähelahustuvad testained lisatakse selles faasis massi või mahu järgi otse kolbi või neid käsitsetakse 3. liites kirjeldatud moel. CO₂-püüduri kambritesse lisatakse kaaliumhüdroksiidi, naatronlubja graanuleid või muud absorbenti.

V.2.5. **Kolbide arv tüüpilises katses**

Kolvid 1 ja 2: katsesuspensioon.

Kolvid 3 ja 4: inokulaadi nullproov.

Kolb 5: protseduuri kontrollproov.

Eelistatavalt ja vajaduse korral:

kolb 6: steriilne kontrollproov,

kolb 7: mürgisuse kontrollproov.

Vt ka punkti I.6.7.

V.2.6. **Katse tegemine**

Kolbidel lastakse jõuda soovitud temperatuurini ning asjaomased kolvid inokuleeritakse ettevalmistatud aktiivmuda või muud päritolu inokulaadiga lõpliku hõljumi kontsentratsiooniga kuni 30 mg/l. Katseaparatuur pannakse kokku, käivitatakse segaja ning kontrollitakse seadme hermeetilisust ja alustatakse hapnikutarbe mõõtmist. Üldjuhul ei ole vaja katseaparatuuri rohkem jälgida, välja arvatud vajalike tulemuste registreerimine ja igapäevase temperatuuri- ja segamisrežiimi kontrollimine.

Hapnikutarve arvutatakse regulaarselt ja sageli loetavate näitude põhjal, seadme tootja ette nähtud meetodite abil. Inkubatsiooniperioodi lõpus, tavaliselt 28 päeva pärast, mõõdetakse kolbide pH, eriti kui hapnikutarve on madal või kõrgem kui ThODNH₄ (lämmastikku sisaldavate ühendite puhul).

▼B

Vajaduse korral võetakse respiromeetri kolbides katse alguses ja lõpus proove DOC analüüsiks või spetsiifilise aine analüüsiks (vt II.4 liidet). Pärast proovi võtmist katse alguses peab teada olema kolbi jääva katsesuspensiooni maht. Kui hapniku tarbimine on tingitud lämmastikku sisaldavast testainest, mõõdetakse nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni tõus 28 päeva jooksul ja arvutatakse välja nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus (V liide).

V.3. ANDMED JA ARUANDLUS

V.3.1. Tulemuste käsitlemine

Testaine hapnikutarve (mg) kindlaksmääratud aja möödumisel (millest on lahutatud inokulaadiga nullproovi vastav näitaja sama aja kohta) jagatakse kasutatud testaine massiga. Nii saadakse BHT väärtus, mis on väljendatud hapniku massina (mg) testaine massi (mg) suhtes, st

$$\text{BHT} = \frac{(\text{Testaine hapnikutarve (mg)} - \text{nullproovi hapnikutarve (mg)})}{(\text{Testaine kogus kolvis (mg)})}$$

= hapnikutarve (mg) testaine massiühiku (mg) kohta.

Biolagundumise protsent arvutatakse kas valemist:

$$\text{biolagundumise protsent} = \% \text{ ThOD} = \frac{\text{BHT}(\text{O}_2 \text{ (mg)/testaine (mg)})}{\text{ThOD}(\text{O}_2 \text{ (mg)/testaine (mg)})} \times 100$$

või valemist

$$\% \text{ COD} = \frac{\text{BOD}(\text{O}_2 \text{ (mg)/testaine (mg)})}{\text{COD}(\text{O}_2 \text{ (mg)/testaine (mg)})} \times 100$$

Tuleb märkida, et kui need kaks meetodit ei anna alati samasugust tulemust, on eelistatav kasutada esimest meetodit.

Lämmastikku sisaldavate testainete puhul tuleb kasutada asjakohast ThOD-d (NH_4 või NO_3) vastavalt nitrifikatsiooni teadaolevale või eeldatavale toimumisele. Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, arvutatakse nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus välja nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutustest (V liide).

Valikulistel orgaanilise süsiniku ja/või spetsiifilise aine määramistel arvutatakse lagunemisprotsent punktis I.7 kirjeldatud moel.

Kõik tulemused registreeritakse etteantud andmetabelis.

V.3.2. Tulemuste kehtivus

Inokulaadiga nullproovi hapnikutarve 28 päeva jooksul on üldjuhul 20–30 mg O_2 /l ega tohiks ületada 60 mg/l. Kui saadavad väärtused on suuremad kui 60 mg/l, tuleks andmed ja katsetehnika kriitiliselt üle vaadata. Kui pH jääb väljapoole vahemikku 6–8,5 ja testaine hapnikutarve on alla 60 %, tuleks katset testaine madalama kontsentratsiooniga korrata.

Vt ka punkti I.5.2.

▼B

		Aeg (päevades)											
		0		7		14			21			28	
Lagunemisprot- sent $\frac{\text{BOD}}{\text{ThOD}} \times 100$	D ₁ (a ₁)												
	D ₂ (a ₂)												
	Keskmine (*)												

V = lahuse maht katsekolvis

(*) D₁ ja D₂ ei tohiks olulise erinevuse puhul keskmistada.

NB: Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabelleid.

6. NITRIKATSIOONI ARVESTAV PARANDUS (vt V liidet)

Päev	0	28	Erinevus
i) Nitraadi kontsentratsioon (mg N/liitris),			(N)
ii) Hapnikuekvivalent ($4,57 \times N \times V$) (mg)	—	—	
iii) Nitriti kontsentratsioon (mg N/liitris)			(N)
iv) Hapnikuekvivalent ($3,43 \times N \times V$) (mg)	—	—	
ii + iv) Summaarne hapnikuekvivalent	—	—	

7. SÜSINIKU ANALÜÜS (pole kohustuslik)

Süsinikuanalüsaator:

Aeg (päevades)	Nullproov (mg/l)	Testaine mg/l
0	(C _{blo})	(C _o)
28 (¹)	(C _{blt})	(C _t)

(¹) või inkubatsiooniperioodi lõpus

$$\% \text{ DOC kõrvaldamisprotsent} = \left(1 - \frac{C_t - C_{blt}}{C_o - C_{blo}} \right) \times 100$$

8. SPETSIIFILINE AINE (pole kohustuslik)

S_b = kontsentratsioon füüsikalis-keemilises (steriilses) kontrollproovis 28 päeva möödumisel.

S_a = kontsentratsioon inokuleeritud kolvis 28 päeva möödumisel.

$$\% \text{ biolagundumise protsent} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

9. ABIOOTILISE LAGUNEMISE KATSE (pole kohustuslik)

a = hapnikutarve steriilsetes kolvides 28 päeva möödumisel (mg)

$$\text{hapnikutarve testaine mg kohta} = \frac{a}{C_o V}$$

▼B

(vt jaotiseid 1 ja 3)

$$\text{abiootilise lagunemise protsent} = \frac{a \times 100}{C_0 V \times \text{ThOD}}$$

VI OSA KINNISE PUDELI KATSE (meetod C.4-E)**VI.1. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE**

Testaine lahuse mineraalse toitelahuses, üldjuhul kontsentratsiooniga 2–5 mg/l, inokuleeritakse suhteliselt väikese arvu segapopulatsiooni mikroorganismidega ja seda hoitakse täiesti täis suletud pudelites konstantsel temperatuuril. Lagunemisprotsessi jälgitakse 28 päeva jooksul lahustunud hapniku analüüsimisega. Testaine hapnikutarve (mida on parandatud paralleelse inokulaadiga nullproovi vastava väärtuse võrra) väljendatakse protsendina ThOD-st või KHT-st.

VI.2. MEETODI KIRJELDUS**VI.2.1. Seadmed**

- a) Klaaskorkidega BHT pudelid mahuga näiteks 250–300 ml.
- b) Vesivann või inkubaator pudelite termostateerimiseks konstantsel temperatuuril (± 1 °C või täpsem) pimedas.
- c) Suured klaaspudelid (2–5 l) lahuste valmistamiseks ja BHT pudelite täitmiseks.
- d) Hapnikuelektrood ja -mõõtur või seadmed ja reaktiivid Winkleri tiitrimiseks.

VI.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine

Põhilahuste valmistamist vt I.6.2.

1 (üks) ml lahuseid a kuni d segatakse kokku ja täiendatakse lahjendusveega 1 liitrini.

VI.2.3. Inokulaadi valmistamine

Inokulaat valmistatakse üldjuhul valdavalt olmereovett töötlevast puhastusjaamast või laborimõõdus seadmest väljuvast töödeldud reoveest. Veel üks võimalik inokulaadi allikas on pinnavesi. Üldjuhul lisatakse liitri lahuse kohta üks tilk (0,05 ml) kuni 5 ml filtraati; antud reoveele vastava optimaalse koguse määramiseks võib vaja olla eelkatseid (vt I.6.4.2 ja I.6.5).

VI.2.4. Kolbide ettevalmistamine

Mineraalset toitelahust aereeritakse tugevalt vähemalt 20 minutit. Igas katseseerias tuleb kasutada ainult samast partiist pärinevat mineraalset toitelahust. Üldjuhul on lahuse kasutusvalmis pärast 20tunnist katsetemperatuuril seismist. Kontrollimiseks määratakse lahustunud hapniku kontsentratsioon, mis peaks 20 °C juures olema umbes 9 mg/l. Kõik ülekande- ja täitmisoperatsioonid õhuga küllastatud toitelahusega tuleb teha mullivabalt, näiteks sifooni abil.

▼B

Test- ja võrdlusainete uurimiseks üheaegsetes katseseeriates valmistatakse ette paralleelsed BHT pudelite rühmad. Katses kasutatakse küllaldast arvu BHT pudeleid, sealhulgas inokulaadiga nullproove, nii et soovitatavate ajavahemike, näiteks 0, 7, 14, 21 ja 28 päeva järel, saab hapnikutarvet mõõta vähemalt kahes paralleelis. Kümnepäevase akna määramiseks võib vaja olla täiendavaid pudeleid.

Suured pudelid täidetakse põhjalikult aereeritud mineraalse toitelahusega umbes ühe kolmandiku ulatuses. Seejärel lisatakse eraldi suurtesse pudelitesse küllaldased kogused test- ja võrdlusainete põhilahuseid nii, et kemikaalide lõplik kontsentratsioon ei ületa üldjuhul 10 mg/l. Täiendavas suures pudelis olevale kemikaalivabale kontrolltoitelahusele kemikaale ei lisata.

Et mitte piirata inokulaadi aktiivsust, ei tohi lahustunud hapniku kontsentratsioon BHT pudelites langeda alla 0,5 mg/l. Seega on testaine kontsentratsioon piiratud umbes 2 mg/l. Raskestilagunevate ja madala ThOD-ga ühendite puhul võib siiski kasutada kontsentratsiooni 5–10 mg/l. Mõningatel juhtudel võib soovitada teha paralleelseid katseseeriaid kahe erineva testaine kontsentratsiooniga, näiteks 2 ja 5 mg/l. ThOD arvutatakse üldjuhul ammooniumisoolade moodustumise põhjal, kuid kui eeldatakse nitrifikatsiooni toimumist või selle toimumine on teada, arvutatakse see nitraadi moodustumise põhjal (ThODNO₃: vt II liite punkti 2). Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, parandatakse tulemust, arvestades analüütiliselt leitud nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutusi (vt V liidet).

Testaine mürgisuse uurimisel (näiteks madala biolagunduvuse tulemuse puhul) on vaja veel üht pudeliseeriat.

Valmistatakse ette veel üks suur pudel, mis sisaldab aereeritud mineraalset toitelahust (umbes 1/3 pudeli mahust) ja ülejäänud suurte pudelitega võrdses kontsentratsioonis nii test- kui ka võrdlusainet.

Lahused suurtes pudelites inokuleeritakse töödeldud reoveega (1 tilk ehk umbes 0,05 ml kuni 5 ml/l) või muu inokulaadi, nagu jõeveega (vt I.6.4.2). Seejärel täiendatakse lahused aereeritud mineraalse toitelahusega vajaliku mahuni, kasutades piisava segunemise saavutamiseks pudeli põhjani ulatuvat voolikut.

VI.2.5. **Kolbide arv tüüpilises katses**

Tüüpilises katses kasutatakse järgmisi pudeleid:

- vähemalt 10 pudelit testaine ja inokulaadiga (katsesuspensioon);
- vähemalt 10 pudelit ainult inokulaadiga (inokulaadiga nullproov);
- vähemalt 10 pudelit võrdlusaine ja inokulaadiga (protseduuri kontrollproov),

▼B

- ning vajaduse korral 6 pudelit nii testaine, võrdlusaine kui ka inokulaadiga (mürgisuse kontrollproov). Kümnepäevase akna määramiseks võib aga vaja olla umbes kahekordset arvu pudelid.

VI.2.6. Katse tegemine

Kõik valmis lahused viiakse kohe vastavasse BHT pudelite rühma, kasutades voolikut, mille ots on BHT pudelite täielikuks täitmiseks vastava suure pudeli alumises veerandis (mitte põhjas). Õrnalt koputades eemaldatakse õhumullid. Nullhetkel määratakse kõigis pudelites Winkleri meetodi või hapnikuelektroodi abil kohe lahustunud hapnik. Proovid võib mangaan(II)sulfaadi ja naatriumhüdroksiidi (esimese Winkleri reaktiivi) abil konserveerida hilisemaks analüüsiks, kasutades Winkleri meetodit. Hoolikalt suletud pudelid, milles hapnik on fikseeritud pruuni mangaan(III)oksiidi hüdraadina, hoitakse enne Winkleri meetodi järgmiste etappidega jätkamist pimedas 10–20 °C juures kõige rohkem 24 tundi. Ülejäänud paralleelpudelid suletakse õhumullide pudelitesse jäämise vältimiseks korgiga ja inkubeeritakse 20 °C juures pimedas. Iga katseseeriaga peab kaasnema täielik paralleelseeria inokuleeritud, testaineta toitelahuse uurimiseks. Igast seeriast võetakse 28 päeva jooksul kindlate ajavahemike järel (vähemalt kord nädalas) korraga vähemalt kaks pudelit lahustunud hapniku määramiseks.

Nädalaste vahedega võetud proovid võimaldavad määrata kõrvaldamisprotsendi 14päevases aknas, 3–4päevaste vahedega võetud proovid võimaldavad määrata kümnepäevase akna, selleks on vaja umbes kaks korda rohkem pudelid.

Lämmastikku sisaldavate testainete puhul tuleb tulemusesse teha nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus. Selleks määratakse hapnikuelektroodi abil lahustunud hapniku kontsentratsioon ja võetakse BHT pudelist nitriti ja nitraadi analüüsiks proov. Nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni tõusu järgi arvutatakse välja vastav hapnikutarve (vt V liidet).

VI.3. ANDMED JA ARUANDLUS

VI.3.1. Tulemuste käsitlemine

Kõigepealt arvutatakse iga ajavahemiku BHT, lahutades testaine hapnikutarbest inokulaadiga nullproovi hapnikutarbe (mg/l). Suhtelise BHT (hapniku ja testaine masside (mg) suhte) saamiseks jagatakse parandatud hapnikutarve testaine kontsentratsiooniga (mg/l). Protsentuaalne biolagunduvus arvutatakse suhtelise BHT jagamisel suhtelise (II liite punktis 2 kirjeldatud viisil arvutatud) ThOD-ga või KHT-ga (mis on määratud analüütiliselt, vt II.3 liidet), seega:

$$\text{BOD} = \frac{\text{Testaine hapnikutarve (mg)} - \text{nullproovi hapnikutarve (mg)}}{\text{Testaine kogus kolvis (mg)}}$$

▼B

= hapnikutarve (mg) testaine massiühiku (mg) kohta

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{BHT}(\text{O}_2 \text{ (mg)})/\text{testain e (mg)}}{\text{ThOD}(\text{O}_2 \text{ (mg)})/\text{testaine(mg)}} \times 100$$

või

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{\text{BHT}(\text{O}_2 \text{ mg/testain e mg})}{\text{KHT}(\text{O}_2 \text{ mg/testain e mg})} \times 100$$

Tuleb märkida, et kui need kaks meetodit ei anna alati samasugust tulemust, on eelistatav kasutada viimast meetodit.

Lämmastikku sisaldavate testainete puhul tuleb kasutada asjakohast ThOD-d (NH₄ või NO₃) vastavalt nitrifikatsiooni teadaolevale või eeldatavale toimumisele (II liite punkt 2). Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, arvutatakse nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus välja nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutustest (V liide).

VI.3.2. Tulemuste kehtivus

Inokulaadiga nullproovi hapnikutarve 28 päeva jooksul ei tohiks olla suurem kui 1,5 mg/l. Kui saadavad väärtused on suuremad, tuleks katsetehnika üle vaadata. Lahustunud hapniku kontsentratsioon katsepudelites ei tohiks millalgi langeda alla 0,5 mg/l. Sellised madalad hapnikusisaldused saab kehtivaks lugeda ainult juhul, kui kasutatav lahustunud hapniku määramise meetod võimaldab selliseid sisaldusi täpselt määrata.

Vt ka punkti I.5.2.

VI.3.3. Aruandlus

Vt punkti I.8.

VI.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

KINNISE PUDELI KATSE

1. **LABOR**
2. **KATSE ALGUSKUUPÄEV**
3. **TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: ... mg/l

Algkontsentratsioon pudelis: ... mg/l

ThOD või KHT: ... O₂ (mg)/testaine (mg)

4. **INOKULAAT**

Allikas:

Töötlus:

▼B

Kohandamine, kui seda tehti:

Kontsentratsioon katseseigus: ... mg/l

5. LAHUSTUNUD HAPNIKU MÄÄRAMINE

Meetod: Winkler/elektrood

Kolbide analüüsitulemused

Inkubatsiooniaeg (d)			Lahustunud hapnik (mg/l)			
			0	n ₁	n ₂	
Nullproov (kemikaalita)	1	C ₁				
	2	C ₂				
Keskmine	$m_b = \frac{C_1 + C_2}{2}$					
Testaine	1	a ₁				
	2	a ₂				
Keskmine	$m_t = \frac{a_1 + a_2}{2}$					

Märkus. Võrdlusaine ja mürgisuse kontrollproovide jaoks võib kasutada analoogseid tabeleid.

6. NITRIFIKATSIOONI ARVESTAV PARANDUS (vt V liidet)

Inkubatsiooniaeg (d)		0	n ₁	n ₂	n ₃
i)	Nitraadi kontsentratsioon (mg N/liitris)				
ii)	Nitraadi kontsentratsiooni muutus (mg N/liitris)	—			
iii)	Hapnikuekvivalent (mg/l)	—			
iv)	Nitriti kontsentratsioon (mg N/liitris)				
v)	Nitriti kontsentratsiooni muutus (mg N/liitris)	—			
vi)	Hapnikuekvivalent (mg/l)	—			
iii + vi)	Summaarne hapnikuekvivalent (mg/l)	—			

7. LAHUSTUNUD HAPNIKU TARBIMINE: LAGUNEMIS-PROTSENT

	Tarbimine n päeva pärast (mg/l)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
1. KOLB: (m _{to} - m _{tx}) - (m _{bo} - m _{bx})				
2. KOLB: (m _{to} - m _{tx}) - (m _{bo} - m _{bx})				

▼ B

	Tarbimine n päeva pärast (mg/l)			
	n ₁	n ₂	n ₃	
1. KOLB: $\% D_1 = \frac{[(m_{t_0} - m_{t_x}) - (m_{b_0} - m_{b_x})] \times 100}{\text{katsekonts.} \times \text{ThOD kemikaal}}$				
2. KOLB: $\% D_2 = \frac{[(m_{t_0} - m_{t_x}) - (m_{b_0} - m_{b_x})] \times 100}{\text{katsekonts.} \times \text{ThOD kemikaal}}$				
keskmise %D (*) = $\frac{D_1 + D_2}{2}$				

(*) Kordustulemuste olulise erinevuse puhul mitte keskmistada.

m_{t_0} = väärtus katsekolvis ajahetkel 0

m_{t_x} = väärtus katsekolvis ajahetkel x

m_{b_0} = nullproovi keskmine väärtus ajahetkel 0

m_{b_x} = nullproovi keskmine väärtus ajahetkel x

Teha tuleb ka nitrifikatsiooni arvestav parandus jaotise 6 punktist iii + vi.

8. LAHUSTUNUD HAPNIKU TARBIMINE NULLPROOVIDES

Nullproovi hapnikutarve: ($m_{b_0} - m_{b_{28}}$) mg/l. Nullproovi hapnikutarve on oluline katse kehtivuse seisukohalt. See peaks olema alla 1,5 mg/l.

VII OSA MITI KATSE (meetod C.4-F)

VII.1. PÕHIMÕTE

28 päeva kestel mõõdetakse automaatselt pimedas, suletud respiromeetris 25 ± 1 °C juures oleva, pidevalt segatava, testainest ja mineraalsest toitelahusest koosneva, spetsiaalselt kasvatatud, adapteerimata mikroorganismidega inokuleeritud lahuse või suspensiooni hapnikutarvet. Tekkinud süsinikdioksiid absorbeeritakse naatronlühajaga. Biolagunduvust väljendatakse nullproovi hapnikutarbe võrra parandatud hapnikutarbe protsendina teoreetilisest hapnikutarbest (ThOD). Lisaks arvutatakse inkubeerimise algul ja lõpul tehtava täiendava keemilise analüüsi ja soovi korral ka DOC analüüsi põhjal esmase biolagundumise määr.

VII.2. MEETODI KIRJELDUS

VII.2.1. Seadmed

a) Automaatne elektrolüütiline BHT mõõtur või respiromeeter, tavaliselt kuue 300 ml pudeliga ja topsidega CO₂ absorbendi jaoks.

▼B

- b) Püsiva temperatuuriga ruum ja/või veevann temperatuuriga 25 °C, lubatava kõikumisega ± 1 °C või alla selle.
- c) Membraanfiltratsiooni seade (pole kohustuslik).
- d) Süsinikuanalüsaator (pole kohustuslik).

VII.2.2. Mineraalse toitelahuse valmistamine

Analüüsipuhastest reaktiividest ja veest (1.6.1) valmistatakse järgmised põhilahused:

- | | | |
|----|---|---------|
| a) | Kaaliumdivesinikfosfaat, KH_2PO_4 | 8,50 g |
| | Dikaaliumvesinikfosfaat, K_2HPO_4 | 21,75 g |
| | Dinaatriumvesinikfosfaatdodekahüdraat, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ | 44,60 g |
| | Ammooniumkloriid, NH_4Cl | 1,70 g |
| | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini | |
| | Lahuse pH peaks olema 7,2 | |
| b) | Magneesiumsulfaatheptahüdraat, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 22,50 g |
| | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini | |
| c) | Veevaba kaltsiumkloriid, CaCl_2 | 27,50 g |
| | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini | |
| d) | Raud(III)kloriidheksahüdraat, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g |
| | Lahustatakse vees ja täiendatakse veega 1 liitrini | |

3 ml igast lahusest a kuni d segatakse kokku ja täiendatakse 1 liitrini.

VII.2.3. Inokulaadi valmistamine

Võetakse värsked proovid vähemalt kümnest kohast, peamiselt piirkondadest, kus kasutatakse ja kuhu suunatakse mitmesuguseid kemikaale. Üheliitrised muda, pindmise mullakihi, vee- jms proovid võetakse näiteks olme- ja tööstusliku heitvee puhastitest, jõgedest, järvedest ja meredest ning segatakse need hoolikalt kokku. Pärast hõljumi kõrvaldamist ja mõningast seismist viiakse supernatandi pH naatriumhüdroksiidi või fosforhappe abil väärtuseni 7 ± 1 .

Sobiva koguse filtritud supernatandiga täidetakse edaspidi regulaarselt täidetav ja osaliselt tühjendatav aktiivmuda anum ja vedelikku aereeritakse umbes 23,5 tundi. 30 minutit pärast aereerimise lõppu kõrvaldatakse umbes kolmandik supernatandist ja lisatakse settinud materjalile samas mahus lahust (pH 7), mis sisaldab 0,1 % glükoosi, 0,1 % peptooni ja kaaliumdivesinikfosfaati, ning jätkatakse aereerimist. Protseduuri korratakse iga päev. Mudareservuaari tuleb käidelda hea tava kohaselt: väljavool peab olema selge, temperatuur peaks olema 25 ± 2 °C, pH peaks olema 7 ± 1 , muda peaks hästi settima, aeratsioon peaks segu pideva aeroobsuse tagamiseks olema küllaldane, segu peaks sisaldama algloomi ning muda aktiivsust võrdlusaine suhtes tuleks kontrollida vähemalt iga kolme kuu tagant. Muda võib inokulaadina kasutada pärast vähemalt ühekuulist töötlemist, aga hiljemalt nelja kuu pärast. Seejärel võetakse regulaarsete vaheaegade järel vähemalt kord kolme kuu jooksul jälle vähemalt kümnest paigast eespool kirjeldatud proovid.

▼B

Et tagada värske ja vana muda ühesugune aktiivsus, segatakse kasutuses oleva aktiivmuda filtritud supernatant võrdsetes kogustes vahetult enne kogutud kümne allika segu filtritud supernatandiga ja kultiveeritakse saadud segu eespool kirjeldatud moel. Inokulaadiks võetakse muda 18–24 t pärast selle söötmist.

VII.2.4. Kolbide ettevalmistamine

Valmistatakse ette järgmised kuus kolbi:

nr 1: testaine lahjendusvees, kontsentratsioonis 100 mg/l;

nr 2, 3 ja 4: testaine mineraalses toitelahuses, kontsentratsioonis 100 mg/l;

nr 5: võrdlusaine (nt aniliin) mineraalses toitelahuses, kontsentratsioonis 100 mg/l;

nr 6: ainult mineraalne toitelahtus.

Vähealahustuvad testained lisatakse massi või mahu järgi otse katsesegusse või käsitsetakse neid 3. liites kirjeldatud moel, kuid lahusteid ega emulgaatoreid kasutada ei tohiks. Kõikidele kolbidele lisatakse vastavasse tpsi CO₂ absorbent. pH kolbides nr 2, 3 ja 4 viiakse väärtuseni 7,0.

VII.2.5. Katse tegemine

Kolvid nr 2, 3 ja 4 (katsesuspensioonid), nr 5 (inokulaadi aktiivsuse kontrollproov) ja nr 6 (inokulaadiga nullproov) inokuleeritakse sellise väikese koguse inokulaadiga, et hõljumi kontsentratsioon segus oleks 30 mg/l. Abiootilist kontrollproovi kolvis nr 1 ei inokuleerita. Katseaparatuur pannakse kokku, kontrollitakse seadme hermeetilisust, käivitatakse segajad ja alustatakse pimeduses hapnikutarbe mõõtmist. Iga päev kontrollitakse temperatuuri, segajaid ja kulonomeetrilist hapnikutarbe meerikut ning märgitakse üles kõik kolbide sisu värvuse muutused. Sobival moel, näiteks kuue kanaliga meeriku abil jälgitakse vahetult kõigi kolbide BHT-d. Inkubatsiooni-perioodi lõpus, tavaliselt 28 päeva möödumisel, mõõdetakse kolbide pH ja määratakse testaine jääkkontsentratsioon, kõigi vaheühendite kontsentratsioonid ja vees lahustuva ühendi puhul DOC kontsentratsioon (II.4 liide). Lenduvate kemikaalide puhul tuleb olla eriti hoolikas. Kui eeldatakse nitrifikatsiooni toimumist, mõõdetakse võimaluse korral nitriti ja nitraadi kontsentratsioon.

VII.3. ANDMED JA ARUANDLUS**VII.3.1. Tulemuste käsitlemine**

Testaine hapnikutarve (mg) kindla aja möödumisel (millest on lahutatud inokulaadiga nullproovi vastav näitaja sama aja kohta) jagatakse kasutatud testaine massiga. Nii saadakse BHT väärtus, mis on väljendatud hapniku massina (mg) testaine massi (mg) suhtes, st:

$$\text{BHT} = \frac{(\text{Testaine hapnikutarve ve (mg)} - \text{nullproovi hapnikutarve ve (mg)})}{(\text{Testaine kogus kolvis (mg)})}$$

= hapnikutarve (mg)/testaine (mg).

▼ B

Biolagundumise protsent arvutatakse seejärel valemist:

$$\text{biolagundumise protsent} = \text{ThOD \%} \frac{\text{BHT (O}_2 \text{ (mg)/testain e (mg))}}{\text{ThOD (O}_2 \text{ (mg)/testain e(mg))}} \times 100$$

Segude puhul arvutatakse ThOD elementanalüüsi tulemuste põhjal, käsitledes segu ühendina. Kasutada tuleb asjakohast ThOD-d (ThOD_{NH4} või ThOD_{NO3}) vastavalt nitrifikatsiooni toimumisele või mittetoimumisele (II liite punkt 2). Kui nitrifikatsioon toimub, kuid ei ole täielik, tehakse nitrifikatsiooni hapnikutarvet arvestav parandus, mis arvutatakse välja nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutustest (V liide).

Spetsiifilise (lähte-)aine kao järgi arvutatakse esmase biolagundumise protsent (vt I.7.2).

$$D_t = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100\%$$

Kui testaine sisaldus füüsikalisk-keemilist kadu mõõtvast kolvis nr 1 on vähenenud, registreeritakse see ja selles kolvis (S_b) oleva testaine kontsentratsiooni kasutatakse 28 päeva möödumisel biolagundumise protsendi arvutamisel.

DOC analüüside (pole kohustuslik) tegemisel arvutatakse biolagundumise protsent valemist:

$$D_t = \left(1 - \frac{C_t - C_{bt}}{C_o - C_{bo}} \right) \times 100\%$$

vastavalt kirjeldusele punktis I.7.1. Kui DOC sisaldus füüsikalisk-keemilist kadu mõõtvast kolvis nr 1 on vähenenud, kasutatakse DOC kontsentratsiooni selles kolvis biolagundumise protsendi arvutamisel.

Kõik tulemused registreeritakse etteantud andmetabelis.

VII.3.2. Tulemuste kehtivus

Inokulaadiga nullproovi hapnikutarve 28 päeva jooksul on üldjuhul 20–30 mg O₂/l ega tohiks ületada 60 mg/l. Kui saadavad väärtused on suuremad kui 60 mg/l, tuleks andmed ja katsetehnika kriitiliselt üle vaadata. Kui pH jääb väljapoole vahemikku 6–8,5 ja testaine hapnikutarve on alla 60 %, tuleks katset testaine madalama kontsentratsiooniga korrata.

Vt ka punkti I.5.2.

Kui hapnikutarbe põhjal arvatud aniliini lagunemisprotsent ei ole 7 päeva jooksul suurem kui 40 % ja 14 päeva jooksul suurem kui 65 %, loetakse katse tühiiseks.

VII.3.3. Aruandlus

Vt punkti I.8.

VII.4. ANDMETABEL

Järgneb andmetabeli näide.

MITI (I) KATSE

1. LABOR

2. KATSE ALGUSKUUPÄEV

▼B**3. TESTAINE**

Nimi:

Põhilahuse kontsentratsioon: ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Algkontsentratsioon toitelahuses, C_0 : ... (kemikaali sisaldus, mg/l)

Katseseгу maht, V: ... ml

ThOD: ... mg O₂/l**4. INOKULAAT**

Mudavõtukohad:

- | | |
|--------|---------|
| 1) ... | 6) ... |
| 2) ... | 7) ... |
| 3) ... | 8) ... |
| 4) ... | 9) ... |
| 5) ... | 10) ... |

Hõljumi kontsentratsioon aktiivmudas pärast sünteetilise reoveega aklimatiseerimist = ... mg/l

Aktiivmuda maht liitri lõpliku lahuse kohta = ... ml

Muda kontsentratsioon lõplikus lahuses = ... mg/l

5. HAPNIKUTARVE: BIOLAGUNDUVUS

Kasutatava respiromeetri tüüp:

		Aeg (päevades)				
		0	7	14	21	28
Hapnikutarve (mg), testaine	a_1					
	a_2					
	a_3					
Hapnikutarve (mg), nullproov	b					
Parandatud hapnikutarve (mg)	$(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$ $(a_1 - b_1)$					
BHT mg testaine kohta	$\frac{(a - b)}{C_o V}$	1. kolb				
		2. kolb				
		3. kolb				
Lagunemisprotsent		1				
BOD/ThOD × 100		2				
$\frac{BOD}{ThOD} \times 100$		3				
		Keskmine (*)				

(*) Kordustulemuste olulise erinevuse puhul mitte keskmistada.

▼B

NB: Võrdlusaine jaoks võib kasutada analoogseid tabelleid.

6. **SÜSINIKU ANALÜÜS** (pole kohustuslik)

Süsinikuanalüsaator:

Kolb	DOC				DOC kõrvaldamisprotsent	Keskmine
	Mõõdetud		Parandatud			
Vesi + testaine	a				—	—
Muda + testaine	b ₁		b ₁ -c			
Muda + testaine	b ₂		b ₂ -c			
Muda + testaine	b ₃		b ₃ -c			
Testaineta kontrollproov	c		—		—	—

$$\text{kõrvaldamisprotsent} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

7. **SPETSIIFILISE KEEMILISE ANALÜÜSI ANDMED**

	Testaine jääk katse lõpus	Lagunemisprotsent
Nullproov veega	S _b	
Inokuleeritud toitelahus	S _{a1}	
	S _{a2}	
	S _{a3}	

$$\text{lagunemisprotsent} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Lagunemisprotsent arvutatakse kolbide a, a₂ ja a₃ puhul.

8. **MÄRKUSED**

Lisada tuleks BHT kõver ajas, kui see koostati.

▼B*I liide***LÜHENDID JA MÕISTED**

- DO: lahustunud hapnik (mg/l) on vesikeskkonnaga proovis lahustunud hapniku kontsentratsioon.
- BHT: bioloogiline hapnikutarve (g) on mikroorganismide poolt testaine metabolismeermisel tarvitatud hapniku kogus, väljendatakse ka hapnikutarbe (g) ja katseühendi massi (g) suhtena (vt meetodit C.5).
- KHT: keemiline hapnikutarve (g) on testaine oksüdeerimisel kuuma happelise dikromaadiga tarvitatud hapniku kogus, näitab oksüdeeritava materjali sisaldust; väljendatakse ka hapnikutarbe (g) ja katseühendi massi (g) suhtena (vt meetodit C.6).
- DOC: lahustunud orgaaniline süsinik on lahuses olev süsinik, mis läbib 0,45 µm filtri või jääb supernatanti 15minutilise tsentrifugeerimisel 40 000 m/s² (± 4 000 g) juures.
- ThOD: teoreetiline hapnikutarve (mg) on aine täielikuks oksüdeerimiseks vajalik hapnikukogus; arvutatakse brutovalemi järgi (vt II liite punkti 2) ning väljendatakse ka hapnikutarbe (g) ja katseühendi massi (g) suhtena.
- ThCO₂: teoreetiline süsinikdioksiid (mg) on arvutuslik süsinikdioksiidi kogus, mis tekib katseühendi teadaolevast või määratud süsinikusisaldusest katseühendi täielikul mineraliseerumisel; väljendatakse ka mg katseühendi kohta eraldunud süsinikdioksiidi kogusena (mg).
- TOC: proovi kogu orgaaniline süsinik on lahuses ja suspensioonis oleva orgaanilise süsiniku sisalduse summa.
- IC: anorgaaniline süsinik.
- TC: üldsüsinik on proovis oleva orgaanilise ja anorgaanilise süsiniku summa.

Esmane biolagundumine:

bioloogilisest toimest tingitud muutus aine keemilises struktuuris, mille tulemusel see aine kaotab mingi spetsiifilise omaduse.

Lõplik biolagundumine (aerobne):

lagunemise määr, mille puhul mikroorganismid on katseühendi täielikult ära tarvitanud ja muutnud selle süsinikdioksiidiks, veeks, mineraalsooladeks ja uute mikroobsete rakkude osaks (biomassiks).

Bioloogiliselt kergesti lagunduv.

teatavad kindlaksmääratud lõpliku biolagunduvuse sõelkatsed läbinud kemikaalide rangelt määratlemata klassifikatsioon; need katsed on nii ranged, et võib eeldada, et veekeskkonnas aeroobsetes tingimustes biolagunduvad need ühendid kiiresti ja täielikult.

▼B*Potentsiaalselt biolagunduv:*

klassifikatsioon kemikaalide puhul, mille (esmase või lõpliku) biolagunduvuse kohta mis tahes tunnustatud biolagunduvuse katses on kindlaid tõendeid.

Biotöödeldavus:

ühendite kõrvaldatavus biopuhastusjaamades, rikkumata puhastusprotsesside normaalset käiku. Üldjuhul on bioloogiliselt kergesti lagunduvad ühendid biotöödeldavad, samal ajal kui kõik potentsiaalselt biolagunduvad ühendid ei ole biotöödeldavad. Toimida võivad ka abiootilised protsessid.

Ooteaeg:

kõrvaldamiskatses ajavahemik inokulatsioonist kuni hetkeni, kus lagunemine on jõudnud vähemalt 10 %ni. Ooteaja pikkus võib olla väga erinev ja halvasti reprodutseeritav.

Lagunemisaeg:

aeg ooteaja lõpust hetkeni, mil on saavutatud 90 % maksimaalsest lagunemisest.

Kümnepäevane aken

on 10 % lagunemise saavutamisele vahetult järgnevad kümme päeva.

▼B

2. liide

SOBIVATE SUMMAARSETE PARAMEETRITE ARVUTAMINE JA MÄÄRAMINE

Olenevalt valitud meetodist on vajalikud teatavad summaarsed parameetrid. Järgmine jaotis kirjeldab nende väärtuste leidmist. Nende parameetrite kasutamist on kirjeldatud üksikute meetodite juures.

1. Süsinikusisaldus

Süsinikusisaldus arvutatakse testaine teadaoleva elemendilise koostise põhjal või määratakse elementanalüüsil.

2. Teoreetiline hapnikutarve (ThOD)

Teoreetilise hapnikutarbe (ThOD) saab arvutada siis, kui elemendiline koostis on teada või määratakse elementanalüüsil. Järgmise ühendi puhul:



on see nitrifikatsiooni mitteesenemisel

$$ThOD_{NH4} = \frac{16 [2c + 1/2 (h - cl - 3n) + 3s + 5/2p + 1/2 na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

ja nitrifikatsiooni esinemisel

$$ThOD_{NO3} = \frac{16 [2c + 1/2 (h - cl) + 5/2n + 3s + 5/2p + 1/2na - o]}{MW} \text{ mg/mg}$$

3. Keemiline hapnikutarve (KHT)

Keemiline hapnikutarve (KHT) määratakse meetodi C.6 kohaselt.

4. Lahustunud orgaaniline süsinik (DOC)

Lahustunud orgaaniline süsinik (DOC) on määratletud kui mis tahes vees oleva, 0,45 µm filtrit läbiva aine või segu koostises olev orgaaniline süsinik.

Katseanumatest võetakse proovid ja filtritakse kohe sobiva membraanfiltriga filtrimisseadmes. Esimesed 20 ml filtraati (väikeste filtrite kasutamisel võib kogust vähendada) jäetakse kõrvale. 10–20 ml või süstimisel väiksemad kogused (maht sõltub süsinikuanalüsaatori jaoks vajalikust kogusest) jäetakse süsiniku analüüsimiseks alles. DOC kontsentratsioon määratakse orgaanilise süsiniku analüsaatori abil, mis suudab täpselt mõõta süsiniku kontsentratsiooni, mis on 10 % DOC kontsentratsioonist katse alguses või sellest madalam.

Filtritud proove, mida ei saa analüüsida samal tööpäeval, võib säilitada külmikus 2–4 °C juures kuni neli tundi või pikaajalisemal säilitamisel alla –18 °C juures.

Märkused:

Membraanfiltrid on sageli hüdrofiilsuse suurendamiseks immutatud pindaktiivsete ainetega. Seega võib filter sisaldada mitu mg lahustuvat orgaanilist süsinikku, mis segaks biolagunduvuse määramist. Pindaktiivsed ained ja muud lahustuvad orgaanilised ühendid kõrvaldatakse filtritest kolme tunniajase keetmisega deioniseeritud vees. Filtreid võib seejärel nädal aega vees hoida. Ühekordse filterpadruni kasutamisel tuleb iga partii puhul kontrollida, et see ei eralda lahustuvat orgaanilist süsinikku.

▼B

Olenevalt membraanfiltri tüübist võib testaine sellel adsorbeeruda. Seetõttu on soovitatav veenduda, et testainet filtrisse ei jää.

DOC eristamisel TOCst võib filtrimise asemel kasutada 15minutilist tsentrifuugimist $40\,000\text{ m/s}^2$ (4 000 g) juures. Kui DOC algkontsentratsioon on alla 10 mg/l, ei ole see meetod usaldusväärne, kuna kõiki baktereid ei kõrvaldata või lahustatakse osa süsinikust bakteriplasmas.

KIRJANDUS

- 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 388 409 Teil 41 – Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammunter-schlammunter-suchung, Summarische Wirkungs- and Stoffkenngrößen (Gruppe H). Bestimmung des Chemischen Sauerstoffbedarfs (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, 1984,984, vol 133 (1), 169.



3. liide

VÄHELAHUSTUVATE AINETE BIOLAGUNDUVUSE HINDAMINE

Biolagunduvuse katsetes vähelahustuvate ainetega tuleks erilist tähelepanu pöörata järgmistele asjaoludele.

Sellal kui homogeenised vedelikud tekitavad proovi võtmisel harva probleeme, on soovitatav tahked ained sobival moel homogeniseerida, et vältida mittehomoogeensusest tingitud vigu. Eriti hoolikas tuleb olla siis, kui on vaja mõnemilligrammiseid proove suure lisandite sisaldusega segudest või ainetest.

Katsete käigus võib kasutada mitmesuguseid loksutamisi. Loksutada tuleks ainult aine disperseerituna hoidmiseks vajalikul määral, vältides hoolikalt ülekuumutamist, liigset vahutamist ja liigseid nihkejõude.

Kasutada võib emulgaatorit, mille abil saadakse aine stabiilne dispersioon. Emulgaator ei tohiks olla bakteritele mürgine ega olla katse tingimustel biolagunduv või vahtu tekitav.

Lahustitele kehtivad samad nõuded nagu emulgaatoritele.

Tahkete testainete puhul ei ole tahkeid kandjaid soovitatav kasutada, küll aga võivad need olla sobivad õlitaoliste ainete puhul.

Abiainete, nagu emulgaatorite, lahustite ja kandjate kasutamisel tuleks teha nullproov abiainega.

Vähelahustuvate ühendite biolagunduvuse uurimiseks sobivad respiromeetristest katsetest nii CO₂, BHT kui ka MITI katse.

KIRJANDUS

- de Morsier, A. et al., Biodegradation tests for poorly soluble compounds. Chemosphere, 1987, vol. 16, 833.
- Gerike, P., The Biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, vol. 13, 169.

▼B*IV liide***INOKULAADI SUHTES OLETATAVALT MÜRGISTE AINETE
BIOLAGUNDUVUSE HINDAMINE**

Kui aine osutub kohese biolagunduvuse katses näiliselt mittelagunevaks, on inhibeerivuse ja inertsusse eristamise vajaduse korral soovitatav kasutada järgmist meetodit (Reynolds jt, 1987).

Mürgisuse ja biolagunduvuse katsetes tuleks kasutada samasuguseid või identseid inokulaate.

Kohese biolagunduvuse katsetes uuritud ainete mürgisuse hindamiseks peaks sobima muda hapnikutarbe inhibeerimise (aktiivmuda hapnikutarbe inhibeerimiskatse – direktiiv 88/302/EMÜ), BHT ja/või kasvu pidurdumise meetodid või nende kombinatsioon.

Kui mürgisusest tulenevat inhibeerumist soovitakse vältida, on kohese biolagunduvuse katsetes soovitatav kasutada testaine kontsentratsioone, mis on väiksemad kui 1/10 mürgisuse katsetes leitud EC₅₀ väärtustest (ehk väiksemad kui EC₂₀ väärtused). Ühendite puhul, mille EC₅₀ on kõrgem kui 300 mg/l, kohese biolagunduvuse katsetes tõenäoliselt mürgist mõju ei ilmne.

EC₅₀ väärtused alla 20 mg/l tekitavad järgnevat katsetes eeldatavalt tõsiseid probleeme. Kasutada tuleks madalaid katsekonsentratsioone, mistõttu tuleb kasutada ranget ja tundlikku kinnise pudeli katset või ¹⁴C-märgistatud materjali. Aklimatiseerunud inokulaat võib võimaldada kasutada testaine kõrgemaid kontsentratsioone. Viimasel juhul ei ole aga täidetud kohese biolagunduvuse katse konkreetne kriteerium.

KIRJANDUS

Reynolds, L. et al., Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere, 1987, vol. 16, 2259.

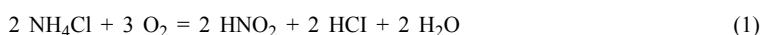


V Liide

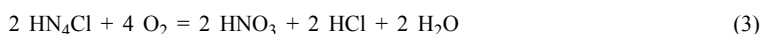
NITRIFIKATSIOONI HAPNIKUTARVET ARVESTAV PARANDUS

Lämmastikku mittesisaldavate testainete puhul on nitrifikatsiooni arvestamatajätmisest tingitud viga testainete biolagundumise hapnikutarbe hindamisel tühine (ei ületa 5 %), isegi kui toitelahuse ammoniakaalse lämmastiku oksüdatsioon toimub ebaühtlaselt, näiteks erinevustega testainega pudelite ja nullproovidega anumate vahel. Lämmastikku sisaldavate testainete puhul võivad aga ilmnedä tõsised vead.

Kui nitrifikatsioon on toimunud, kuid ei ole täielik, võib nitriti ja nitraadi kontsentratsiooni muutuste määramisel parandada segu mõõdetud hapnikutarvet järgmiste valemite põhjal ammooniumiooni nitritiks ja nitraadiks oksüdeerimisel kuluva hapnikukoguse võrra:



Summaarselt:



Valemi 1 põhjal kulub ammooniumkloriidi (NH_4Cl) koosseisus oleva 28 g lämmastiku oksüdeerimisel nitritiks 96 g hapnikku, st vastav teisendustegur on 3,43 (96/28). Samamoodi kulub valemi 3 põhjal 28 g lämmastiku oksüdeerimisel nitraadiks 128 g hapnikku, st vastav teisendustegur on 4,57 (128/28).

Kuna need reaktsioonid on järjestikused ja neid viivad läbi erinevad bakteriliigid, võib nitriti kontsentratsioon nii väheneda kui ka suurenda; viimasel juhul tekib vastav kogus nitraati. Seega on nitraadi tekkel kuluv hapnikukogus 4,57kordne nitraadi kontsentratsiooni tõusuga võrreldes, sellal kui nitriti tekkel kuluv hapnikukogus on 3,43kordne nitriti kontsentratsiooni tõusuga võrreldes ning nitriti kontsentratsiooni vähenemisega seotud hapnikukadu – 3,43kordne nitriti kontsentratsiooni vähenemisega võrreldes.

Seega:

$$\text{O}_2 \text{ kulu nitraadi tekkel} = 4,57 \times \text{nitraadi kontsentratsiooni tõus} \quad (4)$$

ja

$$\text{O}_2 \text{ kulu nitriti tekkel} = 3,43 \times \text{nitriti kontsentratsiooni tõus} \quad (5)$$

ja

$$\text{O}_2 \text{ kadu nitriti kadumisel} = - 3,43 \times \text{nitriti kontsentratsiooni vähenemine} \quad (6)$$

Seega

$$\text{O}_2 \text{ kulu nitrifikatsioonil} = \pm 3,43 \times \text{nitriti kontsentratsiooni muutus} + 4,57 \times \text{nitraadi kontsentratsiooni tõus} \quad (7)$$

ja seega

$$\text{O}_2 \text{ kulu süsiniku oksüdeerimisel} = \text{vaadeldud kogutarve} - \text{nitrifikatsioonist tingitud tarve} \quad (8)$$

Ainult summaarse oksüdeeritud lämmastiku hulga määramisel võib nitrifikatsioonist tingitud hapnikutarbe lugeda esimeses lähenduses oksüdeeritud lämmastiku hulgaga võrreldes 4,57kordseks.

Süsiniku oksüdeerimise hapnikutarbe parandatud väärtust võrreldakse seejärel 2. liite kohaselt arvutatud $\text{ThOD}_{\text{NH}_3}$ väärtusega.

▼B**C.5. LAGUNEMINE – BIOKEEMILINE HAPNIKUTARVE****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Käesoleva meetodi abil mõõdetakse tahkete või vedelate orgaaniliste ainete bioloogilist hapnikutarvet (BHT).

Katses leitud andmed kehtivad vees lahustuvate ühendite puhul; siiski võib vähemalt põhimõtteliselt uurida ka lenduvaid ja vees vähelahustuvaid ühendeid.

Meetod on kohaldatav ainult sellistele uuritavatele orgaanilistele katsematerjalidele, mis ei mõju katses kasutatavatel kontsentratsioonidel bakteritele inhibeerivalt. Kui uuritav materjal katsekonsentratsioonil ei lahustu, võib selle hea dispergeerituse saavutamiseks vaja olla erimeetmeid, näiteks ultrahelidispergeerimist.

Madalate biolagunduvuse väärtuste tõlgendamisel ja sobivate katsekonsentratsioonide valikul võivad kasulikud olla andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

BHT määratletakse kindla koguse aine lahuse ettenähtud tingimustel biokeemiliseks oksüdeerimiseks vajaliku lahustunud hapniku massina.

Tulemused väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

1.3. VÕRDLUSAINED

Soovitav on kontrollida inokulaadi aktiivsust sobiva võrdlusaine abil.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Kindel kogus sobivas hästi aereeritud lahuses lahustatud või dispergeeritud ainet inokuleeritakse mikroorganismidega ja inkubeeritakse pimedas kindlaksmääratud konstantse temperatuuriga ruumis.

BHT määratakse lahustunud hapniku sisalduse vahe järgi katse algul ja lõpul. Katse kestus peab olema vähemalt viis ja mitte rohkem kui 28 päeva.

Paralleelselt tuleb teha testaineta nullproov.

1.5. KVALITEEDIKRITERIUMID

BHT määramist ei saa lugeda aine usaldusväärseks biolagunduvuse määramise meetodiks. Meetod sobib kasutamiseks ainult sõelkatsena.

1.6. MEETODI KIRJELDUS

Ainest valmistatakse lähtelahus või dispersioon, mille BHT sobiks kasutatava meetodiga. Seejärel määratakse mis tahes siseriikliku või rahvusvahelise standardmeetodi abil BHT.

▼B**2. ANDMED JA HINDAMINE**

Lähtelahuse BHT arvutatakse vastavalt valitud standarditud meetodile ja väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

3. ARUANDLUS

Ära tuleb märkida kasutatud meetod.

Bioloogilise hapnikutarbena esitatakse vähemalt kolme nõuetekohase mõõtmise keskmine tulemus.

Registreerida tuleb kõik tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti aine lisandeid, füüsikalist olekut, mürgisust ja koostist käsitlevad andmed ja märkused.

Kui bioloogilise nitrifikatsiooni pidurdamiseks kasutatakse lisaainet, tuleb see ära märkida.

4. VIITED

Näitlike standardmeetodite nimekiri:

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. LAGUNEMINE – KEEMILINE HAPNIKUTARVE****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Käesoleva meetodi abil mõõdetakse valitud standarditud, kindlaksmääratud laboritingimustel tahkete või vedelate orgaaniliste ainete keemilist hapnikutarvet (KHT).

Katse tegemisel ja saadud tulemuste tõlgendamisel on kasulik teada aine struktuuri (nt orgaaniline halogeniidsool, orgaaniline Fe^{++} sool, kloororgaaniline ühend).

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Keemiline hapnikutarve iseloomustab aine oksüdeeritavust ja seda väljendatakse kindlaksmääratud laboritingimustel aine oksüdeerimiseks kulunud oksüdeerija kogusele vastava hapniku kogusena.

Tulemused väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

1.3. VÕRDLUSAINED

Uut ainet uurides ei ole võrdlusaineid alati vaja kasutada. Neid tuleks kasutada peamiselt meetodi kalibreerimiseks ja võimaldamaks võrdlust teiste meetodite abil saadud tulemustega.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Kindlaksmääratud kogust vees lahustatud või disperseeritud ainet oksüdeeritakse kahe tunni jooksul tagasijooksuga kuumutamisel kaaliumdikromaadiga kontsentreeritud väävelhappes, hõbesulfaatkatalüsaatori juuresolekul. Dikromadi jääk määratakse raud(II)ammooniumsulfaadi standardlahusega tiitrimisel.

Kloori sisaldavate ühendite puhul lisatakse kloori segava mõju vähendamiseks elavhõbesulfaati ⁽¹⁾.

1.5. KVALITEEDIKRITERIUMID

Rangelt määratlemata määramismeetodi tõttu on KHT „oksüdeeritavuse näitaja” ja on sellisena praktiline meetod orgaanilise aine sisalduse määramiseks.

Katset võib segada kloorisisaldus; KHT määramist võivad segada ka anorgaanilised redutseerijad ja oksüdeerijad.

Mõned tsüklilised ühendid ja paljud lenduvad ained (nt madalamad rasvhapped) ei oksüdeeru selles katses täielikult.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

Ainest valmistatakse lähtelahus või -dispersioon, mille KHT jääb vahemikku 250–600 mg/l.

⁽¹⁾ Pärast kasutamist tuleb elavhõbedasooli sisaldavad lahused ümber töödelda, et vältida elavhõbeda sattumist looduskeskkonda.

▼B*Märkused*

Vähelahustuvate või mittedispergeeruvate ainete puhul võib kaaluda 5 mg KHT-le vastava koguse peenestatud ainet või vedelikku ja viia selle koos veega katseseadmesse.

Sageli ja eriti vähelahustuvate ainete puhul määratakse KHT meetodi ühe variatsiooni kohaselt, st suletud rõhuühtlustajaga süsteemis (H. Kelkenberg, 1975). Selle modifitseeritud meetodi abil saab edukalt uurida ka tavameetodi abil raskesti uuritavaid aineid, nt äädikhapet. Püridiiniga see meetod aga ei toimi. Kui kaaliumdikromaadi kontsentratsioon viiakse viite 1 kohaselt väärtuseni 0,0416 M (0,25 N), võimaldab see 5–10 mg ainet otse sisse kaaluda, mis on vees vähelahustuvate ainete KHT määramisel väga oluline (viide 2).

Muul juhul määratakse KHT seejärel mis tahes siseriikliku või rahvusvahelise standarditud meetodi abil.

2. ANDMED JA HINDAMINE

Kolvi sisu KHT arvutatakse valitud standarditud meetodi abil ja väljendatakse grammides grammi testaine kohta.

3. ARUANDLUS

Ära tuleks märkida kasutatud standardmeetod.

Keemilise hapnikutarbena esitatakse vähemalt kolme mõõtmise keskmine tulemus. Registreerida tuleb kõik teadaolevad tulemuste tõlgendamist mõjutavad, eriti tulemusi aine lisandeid, füüsikalist olekut ja omadusi käsitlevad andmed ja märkused.

Ära tuleb märkida elavhõbesulfaadi lisamine kloori segava mõju vähendamiseks.

4. VIITED

- 1) Kelkenberg, H., Z. Von Wasser und Abwasserforschung, 1975, vol. 8, 146.
- 2) Gerike, P The biodegradability testing of poorly water soluble compounds. Chemosphere, 1984, 984, vol. 13, 169.

Standardmeetodite näidisloend:

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 the chemical oxygen demand.

DS 217 = water analysis Determination of the chemical oxygen demand.

DIN 38409-H-41 Determination of the chemical oxygen demand (COD) within the range above 15 mg per litre.

NEN 3235 5.3 Bepaling van het chemisch zuurstofverbruik.

ISO 6060 Water quality: chemical oxygen demand dichromate methods.

▼B**C.7. LAGUNEMINE – ABIOOTILINE LAGUNEMINE: HÜDROLÜÜSI SÕLTUVUS pHst****1. MEETOD**

Käesolev katsemeetod vastab suunisele OECD TG 111 (2004).

1.1. SISSEJUHATUS

Kemikaalid võivad sattuda pinnavette otsese kasutamise, pritsmete edasikandumise, äravoolu, drenaaži, jäätmete kõrvaldamise, tööstus-, olme- või põllumajandusheitvee ja atmosfäärisademetega ning võivad pinnavees muunduda keemiliste (nt hüdrolüüs, oksüdatsioon), fotokeemiliste ja/või mikrobioloogiliste protsesside teel. Käesolevas suunises kirjeldatakse laboratoorset katsemeetodit kemikaalide abiootilise hüdrolüütilise muundumise hindamiseks veesüsteemides pH väärtuste juures, mis esinevad tavaliselt keskkonnas (pH 4–9); meetod põhineb olemasolevatel suunistel (1–7).

Katsetega määratakse kindlaks i) uuritava aine hüdrolüüsi kiirus pH funktsioonina ja ii) hüdrolüüsisaaduste, millega organismid võivad kokku puutuda, koostis või laad ning tekkimis- ja lagunemiskiirus. Selliseid uuringuid võib olla vaja kemikaalide puhul, mida juhitakse otse vette või mis võivad sattuda keskkonda muudel eespool kirjeldatud viisidel.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Vt 2. liidet.

1.3. KATSEMEETODI KASUTUSALA

Meetod on üldiselt kasutatav (mürgiseta või mürgisega) keemiliste ainete puhul, mille jaoks on olemas piisava täpsuse ja tundlikkusega määramismeetod. Seda saab kasutada vähelenduva või lendumatu ühendi puhul, mis lahustub piisavalt hästi vees. Käesoleva meetodiga ei tuleks uurida kemikaali, mis lendub vesilahusest väga kergesti (nt fumigant, orgaaniline lahusti) ja mida seetõttu ei saa hoida lahuses käesoleva katse tingimustes. Katset võib olla raske teha vees väga vähe lahustuva ainega (8).

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritav aine viiakse pH eri väärtusega (pH 4, 7 ja 9) steriilsetesse vesipuhverlahustesse ja neid inkubeeritakse kontrollitud laboritingimustes pimedas (püsival temperatuuril). Pärast ettenähtud ajavahe- mike möödumist määratakse puhverlahuses uuritava aine ja hüdrolüüsisaaduste sisaldus. Mürgisega (nt ¹⁴C) aine puhul on kergem koostada massibilanssi.

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse astmelist lähenemisviisi, mida on näidatud ja selgitatud 1. liites. Iga järgmine aste sõltub eelmise tulemustest.

▼B

1.5. ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

Hüdrolüüsi kiiruse mõõtmiseks saab kasutada märgiseta või märgisega ainet. Märgisega ainet tuleb hüdrolüüsisee uurimisel ja massibilansi koostamisel üldiselt eelistada; siiski ei pruugi märgisega aine kasutamine olla erijuhtudel tingimata vajalik. Soovitatakse kasutada ¹⁴C-märgist, kuid teiste isotoopide, näiteks ¹³C, ¹⁵N, ³H tarvitamine võib samuti kasulik olla. Märgisega aatom peaks võimaluse korral paiknema molekuli kõige stabiilsema(te)s osa(de)s. Kui uuritav aine sisaldab näiteks ühte tsükli, peaks märgis olema selles tsükli; kui uuritav aine sisaldab kaht või enam tsükli, võib olla vaja eraldi uuringuid, et hinnata iga märgisega tsükli muundumisi ja saada vajalikku teavet hüdrolüüsisaaduste moodustumise kohta. Uuritava aine puhtus peab olema vähemalt 95 %.

Enne hüdrolüüsikatse tegemist peab olema olemas järgmine teave uuritava aine kohta:

- a) lahustuvus vees (katsemeetod A.6);
- b) lahustuvus orgaanilistes lahustites;
- c) aururõhk (katsemeetod A.4) ja/või Henry konstant;
- d) jaotuskoeffitsient süsteemis n-oktaanol/vesi (katsemeetod A.8);
- e) dissotsiatsioonikonstant (pK_a) (OECD suunis 112) (viide 9);
- f) otse ja kaudse fototransformatsiooni kiirus vees (vajaduse korral).

On vaja määramismeetodeid uuritava aine kvantitatiivseks määramiseks ning vajaduse korral hüdrolüüsisaaduste identifitseerimiseks ja kvantitatiivseks määramiseks vesilahuses (vt ka punkt 1.7.2).

1.6. VÕRDLUSAINED

Hüdrolüüsisaaduste kindlakstegemiseks ja kvantitatiivseks määramiseks spektroskoopiliste ja kromatograafiliste meetodite või muude piisavalt tundlike meetodite abil tuleks võimaluse korral kasutada võrdlusaineid.

1.7. KVALITEEDIKRITERIUMID

1.7.1. Saagis

Uuritava aine määramine puhverlahustest või nende ekstraktidest vähemalt kahes paralleelkatses kohe pärast uuritava aine lisamist annab esimese ettekujutuse määramismeetodi ja uuritava aine lisamise korratavusest. Hilisemate katsestaadiumide puhul saab määramissaagised leida vastavate massibilansside alusel (kui kasutatakse märgisega ainet). Määramissaagis peaks nii märgisega kui ka märgiseta kemikaali puhul olema vahemikus 90–110 % (7). Kui tehniliselt on sellist vahemikku raske saavutada, on 70 %line saagis märgiseta kemikaali puhul lubatav, kuid seda tuleb põhjendada.

▼B**1.7.2. Määramismeetodi korratavus ja tundlikkus**

Uuritava aine ja hüdrolüüsisaaduste kvantitatiivsel määramisel hiljem kasutatava(te) meetodi(te) korratavust saab kontrollida samade puhverlahuste (või nende ekstraktide) paralleelmääramistega siis, kui määramiseks on tekkinud piisav kogus hüdrolüüsisaadusi.

Määramismeetod peab olema piisavalt tundlik, et määrata katseaine kontsentratsioone 10 % või vähem algsest kontsentratsioonist. Vajaduse korral peavad analüüsimeetodid olema ka piisavalt tundlikud, et määrata hüdrolüüsisaaduste kogust, mis moodustab 10 % või enam (ükskõik millisel uuringu hetkel) lisatud kogusest või 25 % või vähem selle saaduse maksimaalsest kontsentratsioonist.

1.7.3. Hüdrolüüsi kineetiliste andmete usaldusvahemikud

Kõigi regressioonikoefitsientide, kiiruskonstantide, poolestusaegade ja muude (nt DT50) kineetiliste parameetrite väärtuste jaoks tuleks arvutada ja esitada usaldusvahemikud.

1.8. KATSEMEETODI KIRJELDUS**1.8.1 Laborivarustus ja seadmed**

Uuring tuleb teha klaasnõudes (nt katseklaasid, väikesed kolvid), vajaduse korral pimedas ja steriilsetes tingimustes, välja arvatud juhul, kui eelnev teave (nagu jaotuskoefitsient n-oktanooli/vee süsteemis) viitab sellele, et uuritav aine võib adsorbeeruda klaasile.

Sellistel juhtudel tuleb võib-olla kaaluda muude materjalide (näiteks Teflon®) kasutamist. Klaasile adsorbeerumise mõju saab vähendada ka järgmiste meetoditega:

- katseanuma külge sorbeerunud uuritava aine ja hüdrolüüsisaaduste massi määramine;
- ultrahelivanni kasutamine;
- kõigi klaasnõude pesemine lahustiga iga katseintervalli ajal;
- kaubanduslikku segu jäljendavate toodete kasutamine;
- suurema koguse kaaslahusti kasutamine uuritava aine lisamiseks süsteemile; kui kasutatakse kaaslahustit, peab see olema selline, mis ei hüdrolüüsi uuritavat ainet.

Tavaliselt on vajalikud kontrollitava temperatuuriga vesivann-loksutid või termostateeritavad inkubaatorid eri katselahuste inkubeerimiseks.

Vaja läheb standardset laborivarustust, eriti järgmisi seadmeid:

- pH-meeter;

▼B

- analüüsiseadmed, nagu GC-, HPLC-, TLC-seadmed, kaasa arvatud vajalikud seadmed radioaktiivse märgisega ja märgiseta ainete määramiseks või isotooplahjenduse pöördmeetodi kasutamiseks;
- seadmed identifitseerimise jaoks (nt MS, GC-MS, HPLC-MS, TMR jne);
- vedelik-stsintillatsiooniloendaja;
- jaotuslehtrid vedelik-vedelik-ekstraktsiooni jaoks;
- seadmed lahuste ja ekstraktide kontsentreerimiseks (nt rotaatorurusti);
- temperatuuri kontrollimise vahend (nt veevann).

Keemiareagentidest läheb vaja näiteks järgmisi:

- analüüsi puhtad orgaanilised lahustid, nagu heksaan, dikloromeetan jne;
- stsintillatsioonivedelik;
- puhverlahused (lähemalt vt punktist 1.8.3).

Kõik hüdrolüüsikatsetes kasutatavad klaasnõud, analüütilise puhtusega vesi ja puhverlahused peavad olema steriliseeritud.

1.8.2. Uuritava aine lisamine

Uuritav aine tuleb lisada vesilahusena erinevatesse puhverlahustesse (vt 3. liidet). Lahustumise parandamiseks on lubatud kasutada väikest kogust veega segunevat lahustit (nagu atsetonitriil, atsetoon, etanool), kuid lahusti kontsentratsioon ei tohi tavaliselt ületada 1 mahuprotsenti. Kõrgemat lahusti kontsentratsiooni võib kasutada (nt halvasti lahustuva uuritava aine puhul) ainult siis, kui saab näidata, et lahusti ei mõjuta uuritava aine hüdrolüüsi.

Kaubanduslikku segu jäljendava toote kasutamist üldiselt ei soovitata, kuna ei saa välistada, et segu koostisosad mõjutavad hüdrolüüsi. Siiski võib kaubanduslikku segu jäljendava materjali kasutamine olla sobiv lahendus vees halvasti lahustuva või klaasile adsorbeeruva uuritava aine puhul (vt punkti 1.8.1).

Tuleks kasutada ühte uuritava aine kontsentratsiooni; see ei tohiks ületada 0,01 M või poolt küllastuskontsentratsiooni (vt 1. liidet).

▼B**1.8.3. Puhverlahused**

Hüdrolüüsikatsed tuleks sooritada pH väärtuste 4, 7 ja 9 juures. Selleks tuleb puhverlahuste valmistamisel kasutada analüüsi puhtaid kemikaale ja vett. Mõned sobivad puhversüsteemid on esitatud 3. liites. Tuleb märkida, et kasutatav puhversüsteem võib mõjutada hüdrolüüsi kiirust ja sellistel juhtudel tuleb kasutada alternatiivset puhversüsteemi ⁽¹⁾.

Iga puhverlahuse pH väärtust tuleb kontrollida kalibreeritud pH-meetriga, mille täpsus on vähemalt 0,1 nõutava temperatuuri juures.

1.8.4. Katsetingimused**1.8.4.1. Katsetemperatuur**

Hüdrolüüsikatsed tuleb teha konstantse temperatuuri juures. Ekstrapoleerimise eesmärgil on oluline hoida temperatuuri vahemikus vähemalt $\pm 0,5$ °C.

Kui uuritava aine hüdrolüüsi kohta ei ole midagi teada, tuleks teha eelkatse temperatuuril 50 °C (1. aste). Edasiste astmete kineetilised katsed tuleb teha vähemalt kolmel temperatuuril (kaasa arvatud katse 50 °C juures), välja arvatud juhul, kui 1. astme katses selgub, et uuritav aine on hüdrolüüsi suhtes stabiilne. Soovitatav temperatuurivahemik on 10–70 °C (eelistatavalt tuleks kasutada vähemalt ühte temperatuuri alla 25 °C); see hõlmab standardtemperatuuri 25 °C ja enamikku välitingimustes esinevaid temperatuure.

1.8.4.2. Valgus ja hapnik

Kõik hüdrolüüsikatsed tuleb teha, kasutades sobivaid meetodeid fotolüüsi vältimiseks. Tuleb võtta kõik sobivad meetmed hapniku toime vältimiseks (nt barboteerimine heeliumi, lämmastiku või argooniga viie minuti jooksul enne lahuse valmistamist).

1.8.4.3. Katse kestus

Eelkatse kestab viis päeva, samal ajal kui kõrgemate astmete katsed tehakse kuni 90 %lise hüdrolüüsini või kestavad 30 päeva, sõltuvalt sellest, kumb aeg on lühem.

1.8.5. Katse käik**1.8.5.1. Eelkatse (1. aste)**

Eelkatse tehakse temperatuuril $50 \pm 0,5$ °C pH väärtuste 4,0, 7,0 ja 9,0 juures. Kui viie päeva pärast täheldatakse alla 10 %list hüdrolüüsi ($t_{0,5\ 25\text{ °C juures}} > 1$ aasta), peetakse uuritavat ainet hüdrolüüsi suhtes stabiilseks ja tavaliselt ei ole täiendavaid katseid vaja. Kui katseaine on teadaolevalt ebastabiilne keskkonna mõistes oluliste temperatuuride juures, ⁽²⁾ ei ole eelkatset vaja teha. Analüüsimeetod peab olema piisavalt täpne ja tundlik, et avastada esialgse kontsentratsiooni 10 %list vähenemist.

⁽¹⁾ Mabey ja Mill soovivad fosfaatpuhvri asemel kasutada boraat- või atsetaatpuhvrit (11).

⁽²⁾ Selline teave võib pärineda muudest allikatest, nagu samalaadse struktuuriga ühendite hüdrolüüsi andmed kirjandusest või muud poolkvantitatiivsed hüdrolüüsi eelkatsed uuritava ainega varasemas väljaandamisetapis.

▼B1.8.5.2. *Ebastabiilse aine hüdrolüüs (2. aste)*

Kõrgema astme katse sooritatakse pH väärtustel, mille juures uuritava aine leiti olevat ebastabiilne vastavalt eespool toodud eelkatse määratlusele. Katseaine puhverdatud lahused termostateeritakse valitud temperatuuridel. Et kontrollida, kas tegemist on 1. järgu reaktsiooniga, tuleb iga reaktsioonilahust analüüsida ajavahemike järel, millega saadakse vähemalt kuus eraldi paiknevat andmepunkti uuritava aine 10–90 %lise hüdrolüüsi vahel. Võetakse individuaalsed paralleelsed proovid (vähemalt kaks proovi eraldi reaktsiooninõudest) vähemalt kuuel proovivõtuajal ja nende sisu analüüsitakse (et saada vähemalt kaksteist paralleeliga andmepunkti). Ühe koondproovi kasutamist, millest igal proovivõtuajal võetakse uuritava aine lahuse individuaalsed alikvoodid, peetakse ebapiisavaks, kuna see ei võimalda analüüsida andmete varieeruvust ja võivad tekkida raskused uuritava aine lahuse saastumise tõttu. Kõrgema astme katse lõpus (st 90 %lise hüdrolüüsi juures või 30 päeva möödudes) tuleb näidata, et lahuse steriilsus on säilinud. Kui lagunemist (st muundumist) ei täheldata, ei peeta steriilsuse katseid siiski vajalikuks.

1.8.5.3. *Hüdrolüüsisaaduste kindlakstegemine (3. aste)*

Sobivate määramismeetoditega tuleb kindlaks teha kõik peamised hüdrolüüsisaadused, vähemalt sellised, mis moodustavad üle 10 % kasutatud kogusest.

1.8.5.4. *Mittekohustuslikud katsed*

Kergesti hüdrolüüsitava uuritava aine puhul võivad olla vajalikud lisakatsed muudel pH väärtustel kui 4, 7 ja 9. Näiteks võib füsioloogiaga seotud eesmärkidel olla vajalik teha katse happelisemates tingimustes (nt pH 1,2) füsioloogiliselt olulise temperatuuri (37 °C) juures.

2. **ANDMED**

Uuritava aine ja hüdrolüüsisaaduste (kui neid on vaja uurida) kogused iga proovivõtuintervalli ning iga pH ja katsetemperatuuri puhul esitatakse, kui see on asjakohane, protsendina esialgsest kasutatud kontsentratsioonist ning vajaduse korral ühikutes mg/l. Kui kasutati määrgisega ainet, tuleb lisaks esitada massibilanss protsendina esialgsest kasutatud kontsentratsioonist.

Tuleb koostada graafik uuritava aine kontsentratsiooni logaritmi sõltuvuse kohta ajast. Kõik peamised hüdrolüüsisaadused, vähemalt need, mis moodustavad ≥ 10 % kasutatud kogusest, tuleb kindlaks teha ja esitada nende kontsentratsiooni logaritmid samal viisil graafikul nagu nende lähteainete puhul, et näidata nende tekkimise ja lagunemise kiirust.

▼B

2.1. ANDMETE TÖÖTLEMINE

Täpsema poolestusaja või DT_{50} väärtuse arvutamiseks tuleb kasutada sobivaid kineetilisi arvutusmudeleid. Poolestusaja ja/või DT_{50} väärtused (koos usalduspiiridega) tuleb arvutada iga pH ja temperatuuri jaoks, näidates ära ka mudeli, mida kasutati reaktsiooni kineetika järgu ja determinatsioonikordaja (r^2) määramisel. Võimaluse korral tuleb need arvutused teha ka hüdrolüüsisaaduste jaoks.

Erinevatel temperatuuridel tehtud kiiruse mõõtmiste puhul tuleb pseudoesimest järku hüdrolüüsi kiiruskonstante (k_{obs}) kirjeldada temperatuuri funktsioonina. Arvutus peaks põhinema nii k_{obs} eraldamisel happekatalüütilise, neutraalse ja alusekatalüütilise hüdrolüüsi kiiruskonstantideks (k_H , $k_{neutral}$, k_{OH}) kui ka Arrheniuse võrrandil:

$$k_{obs} = k_H[H^+] + k_{neutral} + k_{OH}[OH^-] = \sum_{i=H,neutral,OH} A_i e^{-B_i/T}$$

kus A_i ja B_i on regressioonikonstandid, mis leitakse sirge algordinaadist ja tõusust, mis on lineaarse regressiooniga pandud läbi $\ln k_i$ väärtuse ja kelvinites väljendatud absoluutse temperatuuri (T) pöördväärtusega määratud punktide. Kasutades neid Arrheniuse suhteid happekatalüütilise, neutraalse ja alusekatalüütilise hüdrolüüsi jaoks, saab pseudoesimest järku kiiruskonstandid ja seega poolestusajad välja arvutada teiste temperatuuride jaoks, mille puhul otsene eksperimentaalne kiiruskonstandi määramine pole teostatav (10).

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Enamik hüdrolüüsi reaktsioone toimub pseudoesimest järku reaktsioonina ja seetõttu on poolestusajad sõltumatud kontsentratsioonist (vt 2. liites võrrandit 4). See võimaldab tavaliselt 10^{-2} kuni 10^{-3} M juures määratud laboratoorseid tulemusi üle kanda keskkonnamitingimustele ($\leq 10^{-6}$ M) (10). Mabey ja Mill (11) on esitanud rea näiteid selle kohta, et puhtas vees ja looduslikus vees mõõdetud hüdrolüüsi kiirused on eri kemikaalide puhul olnud heas kooskõlas, kui nii pH kui ka temperatuur olid mõõdetud.

3. ARUANDLUS

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuandes tuleks esitada vähemalt järgmine teave.

Uuritav aine:

— tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem (milles on näidatud märgise asukoht, kui kasutatakse radioaktiivse märgisega materjali) ja olulised füüsikalised-keemilised omadused (vt punkti 1.5);

— uuritava aine puhtus (lisandid);

— märgise puhtus märgisega kemikaali puhul ja molaarne aktiivsus (vajaduse korral).

▼ B

- Puhverlahused:
- valmistamise kuupäevad ja üksikasjad;
- kasutatud puhvrid ja vesi;
- puhverlahuste molaarsus ja pH.

Katsetingimused:

- uuringute tegemise kuupäevad;
- uuritava aine kasutatud kogus;
- uuritava aine lisamiseks kasutatud meetod ja lahustid (liik ja kogus);
- inkubeeritud uuritava aine puhverdatud lahuste mahud;
- kasutatud inkubatsioonisüsteemi kirjeldus;
- pH ja temperatuur uuringu jooksul;
- proovivõtuajad;
- ekstraktsioonimeetod(id);
- uuritava aine ja selle hüdrolüüsisaaduste puhverlahuses kindlakstegemise ja nende koguse määramise meetodid;
- paralleelproovide arv.

Tulemused:

- kasutatud määramismeetodite korratavus ja tundlikkus;
- määramissaagised (väärtused (%)) õigesti tehtud uuringu jaoks on esitatud punktis 1.7.1);
- paralleelproovide andmed ja keskmised tabelina;
- massibilanss kogu katse ajal ja lõpus (kui kasutatakse märgisega ainet);
- eelkatse tulemused;
- tulemuste arutelu ja tõlgendamine;
- kõik originaalandmed ja -näidud.

Järgmine teave on vajalik ainult siis, kui määratakse hüdrolüüsi kiirust:

- uuritava aine ja vajaduse korral hüdrolüüsisaaduste kontsentratsiooni graafikud sõltuvusena ajast iga pH väärtuse ja temperatuuri juures;
- Arrheniuse võrrandi tulemuste tabelid temperatuuri 20 °C/25 °C jaoks koos pH, kiiruskonstandi [h^{-1} või päev^{-1}], poolestusaja või DT_{50} ja temperatuuridega [°C], koos usalduspiiride ja korrelatsioonikordaja (r^2) vms andmetega;
- hüpotees hüdrolüüsitee kohta.

▼B

4.

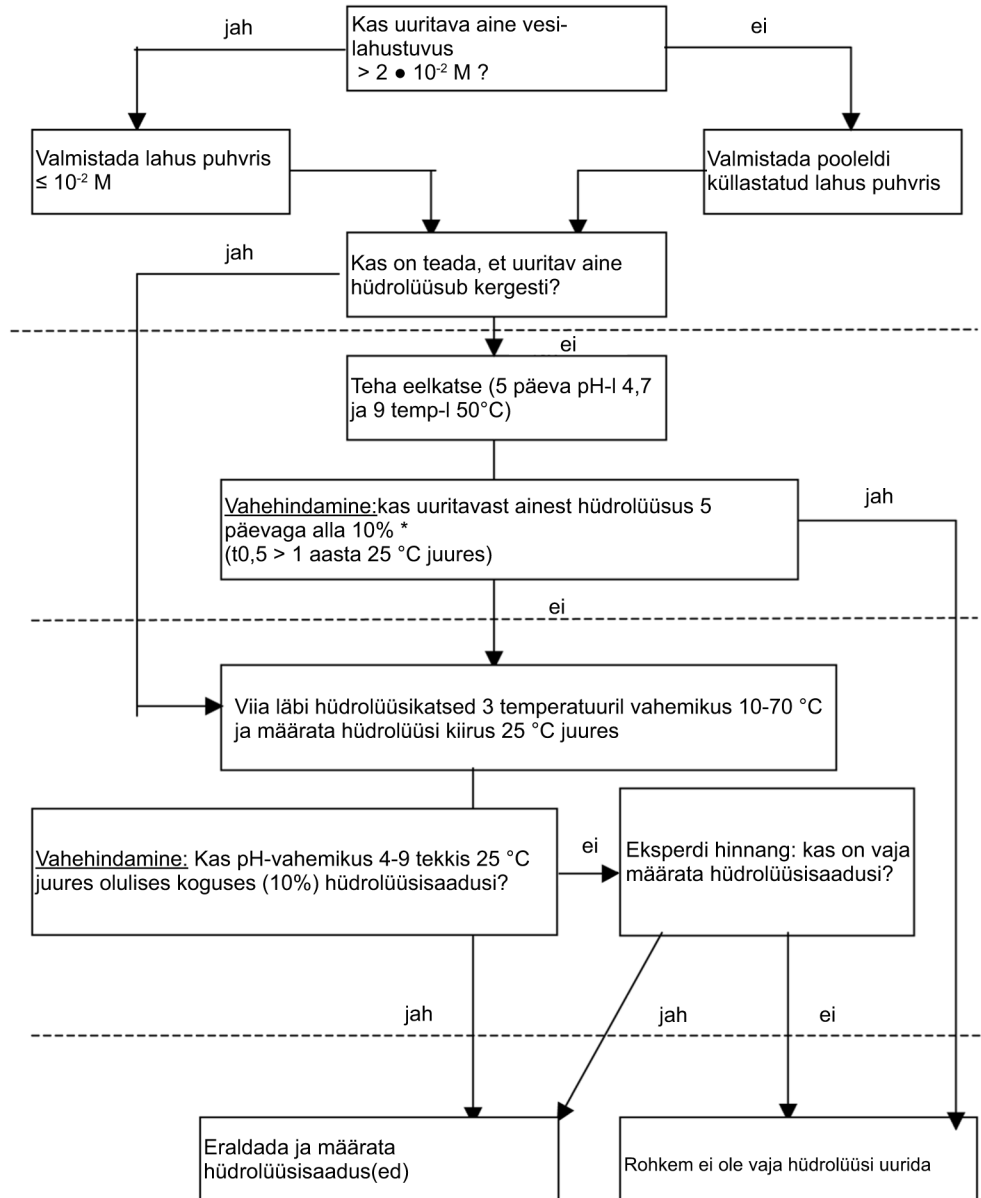
VIITED

- 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) Euroopa Liit (EL) (1995). Komisjoni direktiiv 95/36/EÜ, millega muudetakse nõukogu direktiivi 91/414/EMÜ taimekaitsevahendite turuleviimise kohta; V liide. Säilimine ja toime keskkonnas.
- 5) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1991). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- 6) BBA (1980). Merkblatt Nr. 55, Teil I und II: Prüfung des Verhaltens von Pflanzenbehandlungsmitteln im Wasser (October 1980).
- 7) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- 8) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.
- 9) OECD (1993). Guidelines for the Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994 – 2000): Addenda 6-11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- 10) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).
- 11) Mabey, W. and Mill, T. (1978). Critical review of hydrolysis of organic compounds in water under environmental conditions. J. Phys. Chem. Ref. Data 7, 383–415.

▼B

1. liide

Hüdrolüüsi uuringu astmeline skeem



* Uuritava aine 10 % line hüdrolüüs 50 °C juures vastab umbes 30 päevasele poolestusajale, mis omakorda vastab 1 aastale 25 °C juures.

▼ B

2. liide

Mõisted ja mõõtühikud

Kõigil juhtudel tuleb kasutada **rahvusvahelise süsteemi (SI) standardseid mõõtühikuid**.

Uuritav aine – mis tahes aine, kas lähteühend või asjaomased muundumissaadused.

Muundumissaadused – kõik ained, mis tekivad uuritava aine biotiliste või abiootiliste muundumisreaktsioonide tulemusel.

Hüdroolüüsisaadused – kõik ained, mis tekivad uuritava aine hüdroolüütiliste muundumisreaktsioonide tulemusel.

Hüdroolüüs – uuritava aine RX reaktsioon veega, mille tulemusena X-rühm reaktsioonitsentris asendub OH-rühmaga:



Aine RX kontsentratsiooni vähenemise kiirust selles lihtsustatud protsessis kirjeldab järgmine võrrand:

kiirus = $k [\text{H}_2\text{O}] [\text{RX}]$ teist järku reaktsioon

või

kiirus = $k [\text{RX}]$ esimest järku reaktsioon,

sõltuvalt kiirust määravast staadiumist. Kuna vett on uuritava ainega võrreldes väga palju, kirjeldab seda tüüpi reaktsiooni tavaliselt pseudoesimest järku reaktsiooni võrrand, milles mõõdetav kiiruskonstant on määratud seosega

$$k_{\text{obs}} = k [\text{H}_2\text{O}] \quad [2]$$

ja selle saab määrata valemist ⁽¹⁾

$$k_{\text{obs}} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C_t} \quad [3]$$

kus

t = on aeg

ja C_0, C_t = on RX kontsentratsioonid ajahetkedel 0 ja t .

Selle konstandi ühik on $(\text{aeg})^{-1}$ ja reaktsiooni poolestusaeg (aeg, mis kulub 50 % RX-i reageerimiseks) on määratud seosega

$$t_{0,5} = \frac{\ln 2}{k_{\text{obs}}} \quad [4]$$

Poolestusaeg – ($t_{0,5}$) on aeg, mis kulub 50 % uuritava aine hüdroolüüsiks, kui reaktsiooni saab kirjeldada esimest järku kineetikaga; see ei sõltu kontsentratsioonist.

⁽¹⁾ Kui logaritmitud andmete ja aja seose graafik ei ole sirge (mis vastab esimest järku reaktsioonile), siis ei sobi valem (3) katseaine hüdroolüüsi kiiruskonstandi määramiseks.

▼B

DT₅₀ (50 % kadumisaeg) – aeg, mille jooksul uuritava aine kontsentratsioon väheneb 50 % võrra; see on erinev poolestusajast $t_{0,5}$, kui reaktsioon ei järgi esimest järku kineetikat.

k hindamine eri temperatuuridel

Kui on teada kiiruskonstandid kahe temperatuuri juures, saab kiiruskonstandid teiste temperatuuride juures arvutada Arrheniuse valemiga:

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \text{ või } \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

Graafik, mis kujutab $\ln k$ sõltuvust $1/T$ -st, annab sirgjoone tõusuga $-E/R$,

kus:

k = erinevatel temperatuuridel mõõdetud kiiruskonstant

E = aktivatsioonienergia [kJ/mol]

T = absoluutne temperatuur [K]

R = gaasikonstant [8,314 J/mol.K]

Aktivatsioonienergia arvutatakse regressioonanalüüsi teel järgmisest võrrandist:

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2}\right)}$$

kus $T_2 > T_1$.

▼B

3. liide

Puhversüsteemid

A. CLARK ja LUBS

CLARKI ja LUBSI puhversegud (*)

Koostis	pH
0,2 N HCl ja 0,2 N KCl 20 °C JUURES	
47,5 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,0
32,25 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,2
20,75 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,4
13,15 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,6
8,3 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	1,8
5,3 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	2,0
3,35 ml HCl + 25 ml KCl, lahjendatud kuni 100 ml	2,2
0,1 M kaaliumbiftalaat + 0,1 N HCl 20 °C juures	
46,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	2,2
39,60 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	2,4
32,95 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	2,6
26,42 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	2,8
20,32 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,0
14,70 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,2
9,90 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,4
5,97 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,6
2,63 ml 0,1 N HCl + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	3,8
0,1 M kaaliumbiftalaat + 0,1 N NaOH 20 °C juures	
0,40 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,0
3,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,2
7,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,4
12,15 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,6
17,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	4,8

(*) Nendes tabelites toodud pH väärtused on arvutatud potentsiaali mõõtmistest, kasutades Sørenseni standardvõrrandeid (1909). Vastavad pH väärtused on 0,04 ühikut suuremad kui tabelis olevad väärtused.

▼B

Koostis	pH
23,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,0
29,95 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,2
35,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,4
39,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,6
43,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	5,8
45,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml biftalaati kuni 100 ml	6,0

CLARKI ja LUBSI puhversegud (järg)

0,1 M monokaaliumfosfaat + 0,1 N NaOH 20 °C juures	
5,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,0
8,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,2
12,60 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,4
17,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,6
23,45 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	6,8
29,63 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,0
35,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,2
39,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,4
42,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,6
45,20 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	7,8
46,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml fosfaati kuni 100 ml	8,0
0,1 M H₃BO₃ 0,1 M KCl-s + 0,1 N NaOH 20 °C juures	
2,61 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	7,8
3,97 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,0
5,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,2
8,50 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,4
12,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,6
16,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	8,8
21,30 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,0
26,70 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,2

▼B

32,00 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,4
36,85 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,6
40,80 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	9,8
43,90 ml 0,1 N NaOH + 50 ml boorhapet kuni 100 ml	10,0

B. KOLTHOFF ja VLEESCHHOUWER**KOLTHOFFI ja VLEESCHHOUWERI tsitraatpuhvid (*)**

Koostis	pH
0,1 M monokaaliumtsitraat ja 0,1 N HCl 18 °C juures (*)	
49,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	2,2
43,4 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	2,4
36,8 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	2,6
30,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	2,8
23,6 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,0
17,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,2
10,7 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,4
4,2 ml 0,1 N HCl + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,6
0,1 M monokaaliumtsitraat ja 0,1 N NaOH 18 °C juures (*)	
2,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	3,8
9,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,0
16,3 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,2
23,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,4
31,5 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,6
39,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	4,8
46,7 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,0
54,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,2
61,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,4
68,0 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,6
74,4 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	5,8
81,2 ml 0,1 N NaOH + 50 ml tsitraati kuni 100 ml	6,0

(*) Lisada väike tümooli- või samalaadse aine kristall hallitussente kasvu ärahoidmiseks.

▼B

C. SÖRENSEN

SÖRENSENI boraadisegud

Koostis		Sörensen 18 °C	Walbum, pH temperatuuril:		
ml booraksit	ml HCl/NaOH		10 °C	40 °C	70 °C
0,05 M booraks + 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 booraks + 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

SÖRENSENI fosfaadisegud

Koostis	pH
0,0667 M monokaaliumfosfaat + 0,0667 M dinaatriumfosfaat 20 °C juures	
99,2 ml KH ₂ PO ₄ + 0,8 ml Na ₂ HPO ₄	5,0
98,4 ml KH ₂ PO ₄ + 1,6 ml Na ₂ HPO ₄	5,2
97,3 ml KH ₂ PO ₄ + 2,7 ml Na ₂ HPO ₄	5,4
95,5 ml KH ₂ PO ₄ + 4,5 ml Na ₂ HPO ₄	5,6
92,8 ml KH ₂ PO ₄ + 7,2 ml Na ₂ HPO ₄	5,8
88,9 ml KH ₂ PO ₄ + 11,1 ml Na ₂ HPO ₄	6,0
83,0 ml KH ₂ PO ₄ + 17,0 ml Na ₂ HPO ₄	6,2
75,4 ml KH ₂ PO ₄ + 24,6 ml Na ₂ HPO ₄	6,4
65,3 ml KH ₂ PO ₄ + 34,7 ml Na ₂ HPO 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. TOKSILISUS VIHMAUSSIDELE**

TEHISMULLA KATSE

1. MEETOD**1.1. SISSEJUHATUS**

Selles laboratoorses katses lisatakse uuritav aine tehismullale, milles 14 päeva jooksul usse hoitakse. Pärast seda perioodi (ja valikuliselt seitsme päeva pärast) uuritakse katseaine letaalset mõju vihmaussidele. Katse annab suhteliselt kiire meetodi naha ja seedekulgla kaudu omastatavate kemikaalide mõju skriinimiseks vihmaussidel.

1.2. DEFINITSIOON JA ÜHIK

LC₅₀ – aine kontsentratsioon, mis arvestuslikult tapab uuringuperioodil 50 % katseloomadest.

1.3. VÕRDLUSAINE

Võrdlusainet kasutatakse perioodiliselt kui vahendit, mis näitab, et katse süsteemi tundlikkus pole oluliselt muutunud.

Võrdlusainena soovitatakse kasutada analüütilise klassi kloroatsetamiidi.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

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

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Katse on planeeritud katsesubstraadi ja organismi osas võimalikult hästi korratavana (reprodutseeritavana). Suremus kontrollis ei tohi katse lõpuks olla kõrgem kui 10 %, vastasel juhul on katse kehtetu.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS**1.6.1. Materjalid****1.6.1.1. Katsesubstraat**

Katse põhisubstraadina kasutatakse kindla koostisega tehismulda.

a) Põhisubstraat (protsendid on antud kuivkaalu kohta)

— 10 % *Sphagnum* m²i turvast (pH võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0 ning ilma nähtavate taimejäänusteta, ühtlaselt peenestunud);

▼B

- 20 % kaoliniitsavi, milles võiks olla üle 50 % kaoliniiti;
- umbes 69 % tööstuslikku kvartsiliiva (ülekaalus oleva peene liiva osakestest üle 50 % on suurusega 0,05 kuni 0,2 mm). Kui aine vees piisavalt ei dispergeeru, tuleb jätta 10 g iga katseanuma jaoks saadavale, et see hiljem katseainega segada;
- lisatakse umbes 1 % keemiliselt puhast peenestatud kaltsiumkarbonaati (CaCO_3), et pH oleks $6,0 \pm 0,5$.

b) Katsesubstraat

Katsesubstraat sisaldab põhisubstraati, katseainet ja deioniseeritud vett.

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

c) Kontrollsubstraat

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

1.6.1.2. Katseanumad

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

1.6.2. Katsetingimused

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

Uuringuperiood on 14 päeva, kuid suremust võib hinnata valikuliselt seitse päeva pärast katse algust.

1.6.3. Katse käik

Katse kontsentratsioonid

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

Vahemiku leidmise katse

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

▼B

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

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

Lõplik katse

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

Uuringud, mis kasutavad neid kontsentratsiooni seeriaid, peaks võimaldama LC₅₀ väärtust ja selle usaldatavuse piire hinnata nii täpselt kui võimalik.

Lõpliku katse puhul kasutatakse vähemalt nelja uuringukomplekti iga kontsentratsiooni kohta ja nelja töötlemata kontrolli, igas kümme ussi. Nende korduskomplektide tulemused esitatakse keskmise ja standardhälbe kujul.

Kui kaks järjestikust kontsentratsiooni suhtega 1,8 annavad ainult 0 % ja 100 % surevuse, siis need kaks väärtust on piisavad näitamaks vahemikku, kuhu LC₅₀ langeb.

Katse põhisubstraadi ja uuritava aine segu

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

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

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

Kui uuritav aine pole orgaanilises lahustis lahustatav, disperseeritav või emulgeeritav, segatakse 10 g peeneteralise kvartslüüa ja 500 g kuivkaalus tehismulla töötlemiseks vajaliku katseaine segu 490 g kuiva katsesubstraadiga.

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

▼B

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

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

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

1.6.4. *Katseorganismid*

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

2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE JA HINDAMINE

Uuritud aine kontsentratsioonid esitatakse vastavate surnud vihmausside protsentide suhtes.

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

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

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

3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmist teavet:

- kinnitus, et katse on tehtud vastavalt ülalmainitud kvaliteedikriteeriumidele;
- tehtud katse (vahemiku leidmise uuring ja/või lõplik katse);
- katsetingimuste täpne kirjeldus või kinnitus, et katse on tehtud kooskõlas meetodiga; kõik kõrvalekalded tuleb loetleda;
- täpne uuritava aine ja põhisubstraadi segamise kirjeldus;
- katseorganisme puudutav informatsioon (liik, vanus, keskmine kaal ja kaalude vahemik, hoidmise ja paljundamise tingimused, tarnija);

▼B

- LC₅₀ määramiseks kasutatud meetod;
- katse tulemused koos kõigi kasutatud andmetega;
- katseorganismidel täheldatud sümptomite või käitumise muutuste kirjeldus;
- surevus kontrollides;
- LC₅₀ või kõrgeim katsetatud ilma surevuseta kontsentratsioon ja madalaim 100 %lise surevusega katsetatud kontsentratsioon 14 päeva (ja valikuliselt seitse päeva) pärast katse alustamist;
- kontsentratsiooni/vastusreaktsiooni kõvera joonistamine;
- võrdlusaine abil saadud tulemused, kas seoses käesoleva katsega või varasematest kvaliteedikontrollidest.

4.

VIITED

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 207, Decision of the Council C(81) 30 final.
- 2) Edwards, C. A. and Lofty, J. R., 1977, Biology of Earthworms, Chapman and Hall, London, p. 331.
- 3) Bouche, M. B., 1972, Lombriciens de France, Ecologie et Systematique, Institut National de la Recherche Agronomique, 671 pp.
- 4) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., A simplified method of evaluation dose effect experiments./, Pharm. Exp. Therap., vol. 96, 1949, p. 99.
- 5) Commission of the European Communities, Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms, Report EUR 8714 EN, 1983.
- 6) Umweltbundesamt/Biologische Bundesanstalt für Land- und Forstwirtschaft, Berlin, 1984, Verfahrensvorschlag „Toxizitätstest am Regenwurm *Eisenia foetida* in künstlichem Boden“, in: Rudolph/Boje, Ökotoxikologie, ecomed, Landsberg, 1986.

▼B*Liide***Vihmausside kasvatamine ja hoidmine enne uurimist**

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

Hoidmise ja paljundamise tingimused

Kliimakamber: temperatuur 20 ± 2 °C, eelistatavalt pidevas valguses (intensiivsus 400 kuni 800 luksit).

Kasvatamise

karbid: sobivad 10 kuni 20 l mahuga madalad anumad.

Substraat: *Eisenia foetida*'t võib kasvatada erinevate loomade ekskrementides. Kasvukeskkonnana soovitatakse 50 % turba ja 50 % lehma- või hobusesõnniku segu. Segu pH peaks olema 6 kuni 7 (reguleerida kaltsiumkarbonaadiga) ja ioonjuhtivus madal (väiksem kui 6 mmhos või 0,5 % soola kontsentratsioon).

Substraat peab olema niiske, kuid mitte liiga märg.

Lisaks ülaltoodud meetodile võib kasutada ka teisi tulemuslikke meetodikaid.

Märkus. Olemas on mitu *Eisenia foetida* rassi, mida mõned taksonomistid on eristanud liikidena (Bouche, 1972). Need on morfoloogiliselt sarnased, välja arvatud *Eisenia foetida foetida*, mille segmendid on tüüpiliselt põikitriipude või –ribadega, ja *Eisenia foetida andrei*, millel need puuduvad ja punane värvus on varieerunud. Võib kasutada teisi liike, kui vajalik meetoodika on olemas.

▼B**C.9. BIODEGRADATSIOON ZAHNI-WELLENSI KATSE****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

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

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

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

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

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

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

- on katsetingimustel veeslahustuvad;
- omavad katsetingimustel ebaolulist aururõhku;
- ei ole bakterite suhtes pärssiva toimega;
- imenduvad katsesüsteemi vaid piiratud ulatuses;
- ei kao katselahusest vahu tekke tulemusena.

Katsetulemuste tõlgendamisel on kasulik teada uuritava materjali põhikomponentide kohta käivat teavet. Seda eelkõige juhitudel, kui tulemused on väga väikesed või alammääralsed.

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

▼B

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Katse lõpuks saavutatud biolagunemise määr on Zahni-Wellensi testis tuntud kui „biolagunemine”:

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

kus:

D_T = biodegradatsioon (%) ajahetkel T,

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

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

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

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

Lagunemise ulatus ümardatakse lähima täisarvulise protsendini.

Lagunemise protsent esitatakse kui LOSi (või KHT) eraldamine testitavast ainest.

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

1.3. VÕRDLUSAINED

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

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

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

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

▼B

1.5. KVALITEEDIKRITERIUMID

Käesoleva katse korduvteostatavus on ringtesti järgi piisav.

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

1.6. KATSEPROTSEDUURI KIRJELDUS

1.6.1. *Ettevalmistused*

1.6.1.1. Reagentid

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

Väävelhape, analüüsi reagent (A.R.):	50 g/l
Naatriumihüdroksiidi lahus A.R.:	40 g/l
Mineraalainetega toitelahus: lahustada ühes liitris deioniseeritud vees:	
ammooniumkloriid, NH ₄ Cl, A.R.:	38,5 g
naatriumdiveinikfosfaat, NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, A.R.:	33,4 g
kaaliumdiveinikfosfaat, KH ₂ PO ₄ , A.R.:	8,5 g
dikaaliumvesinikfosfaat, K ₂ HPO ₄ , A.R.:	21,75 g

Segu on nii toitelahuseks kui ka puhversüsteemiks.

1.6.1.2. Seadmed

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

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

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

Tsentrifuug (ligikaudu 3 550 g).

pH-meeter.

Lahustunud hapniku mõõtmise seade.

Paberfiltrid.

▼ B

Aparatuur membraanfiltratsiooniks.

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

Analüüsivarustus orgaanilise süsiniku sisalduse ja hapnikutarve määramiseks.

1.6.1.3. Inokulaadi valmistamine

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

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

Aktiivmuda aktiivsuse kontrollimiseks vt allpool „Funktsionaalne kontroll“.

1.6.1.4. Katselahuste valmistamine

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

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

1.6.2. Katse käik

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

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

▼B

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

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

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

Aktiivmuda funktsionaalne kontroll

Paralleelselt katseanumatega kasutatakse teatud kindlat lahust sisaldavat anumad, et kontrollida aktiivmuda funktsionaalsust. Dietüleenglükool on sellisel juhul osutunud kasulikuks kontrolllahuseks.

Adaptatsioon

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

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

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

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

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

▼B**A n a l ü ü s i k ä i k**

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

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

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

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

2. ANDMED JA HINDAMINE

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

Degradatsiooni ulatus ümardatakse lähima täisarvulise protsendini. Katse lõpus kindlaks tehtud degradatsiooni näitajat esitatakse kui „Biologundatavus Zahni-Wellensi testi järgi”.

Märkus. Kui täielik degradatsioon saavutatakse enne katseaja lõppemist ja seda tulemust kinnitatakse järgneval päeval, võib katse lõpetada.

3. ARUANDLUS**3.1. KATSEARUANNE**

Võimaluse korral peaks katsearuanne sisaldama järgmist teavet:

- uuritava aine algkontsentratsioon;
- kogu ülejäänud teave ja kõik katsetulemused, mis puudutavad uuritavat ainet, võrdlusainet (kui kasutati) ja tühja proovi;
- kontsentratsioon kolme tunni pärast;
- biodegradatsiooni kõver koos selgitustega;
- kuupäev ja koht, kust võeti uuritavate organismide proov, adapterumise kirjeldus, kasutatud kontsentratsioon jne;
- uuringuprotseduuri muutuste teaduslik põhjendus.

3.2. TULEMUSTE TÖLGENDAMINE

LOS (KHT) vähenemine, mis leiab aset järk-järgult päevade ja nädalate jooksul, viitab uuritava aine biodegradeerumisele.

▼B

Mõnikord võib olulist rolli mängida füüsikalise-keemiline adsorptsioon. See on näidatud juhul, kui esineb täielik või osaline lisatud LOS-eliminatsioon alguses (esimese kolme tunni jooksul) ning erinevused kontrolli ja katse supernatandi vahel jäävad oodatust väiksemateks.

Kui biodegradatsiooni (või osalise biodegradatsiooni) ja adsorptsiooni tuleb eristada, on vajalikud täiendavad katsed.

Seda saab teha mitmel erineval viisil, kuid kõige usaldusväärsem on supernatantvedeliku või muda kasutamine inokulaadina baasuuringu raames (eelistatult respiromeetriline uuring).

Selles uuringus tuleks kõrgeid, adsorptsiooni teel mitte eemaldatavaid LOS (KHT) tulemusi pidada potentsiaalselt biolagundatavateks. Osaline adsorptsiooni teel mitteemaldamine viitab sellele, et keemikaal allub vähemalt osalisele biodegradatsioonile. LOS-eemaldamise madalate või null-näitajate põhjuseks võib olla mikroorganismide pärssimine uuritava aine poolt ja selle võib vallandada ka muda lõhustamine või kadu, mis tekitab häguse supernatandi. Testi tuleks korrata, kasutades uuritava aine madalamaid kontsentratsioone.

Spetsiifilise analüütilise meetodi või ^{14}C -märgistatud uuritava aine kasutamine võib anda suurema tundlikkuse. ^{14}C testi ühendi kasutamisel $^{14}\text{CO}_2$ sedastamine kinnitab biodegradatsiooni teket.

Kui tulemusi antakse ka primaarse biodegradatsiooni kohta, tuleks võimaluse korral anda selgitus keemilise struktuuri muutustele, mis viib uuritava eellasühendi vastusreaktsiooni kadumisele.

Analüütilise meetodi kinnitus tuleb edastada koos vastusega, mis saadi puhta katsekeskkonna kohta.

4.

VIITED

- 1) OECD, Paris, 1981, Test *Guideline 302 B*, Decision of the Council C(81) 30 final.
- 2) Annex V C.9 Degradation: Chemical Oxygen Demand, Commission Directive 84/449/EEC (OJ L 251, 19.9.1984, p. 1).



Liide

HINDAMISE NÄIDE

Orgaaniline ühend:	4-etoksübensoehape
Teoreetiline katsekonsentratsioon:	600 mg/l
Teoreetiline LOS:	390 mg/l
Inokulaat	reoveepuhasti
Konsentratsioon:	1 g kuivainet/l
Adaptatsiooni tase:	Pole kohandatud
Analüüs:	LOS-määramine
Proovi kogus:	3 ml
Kontrollaine:	Dietüleenglükool
Ühendi toksilisus:	Toksilised toimed puuduvad kontsentratsioonil alla 1 000 mg/l
	Kasutatud test: ensümaatiline test

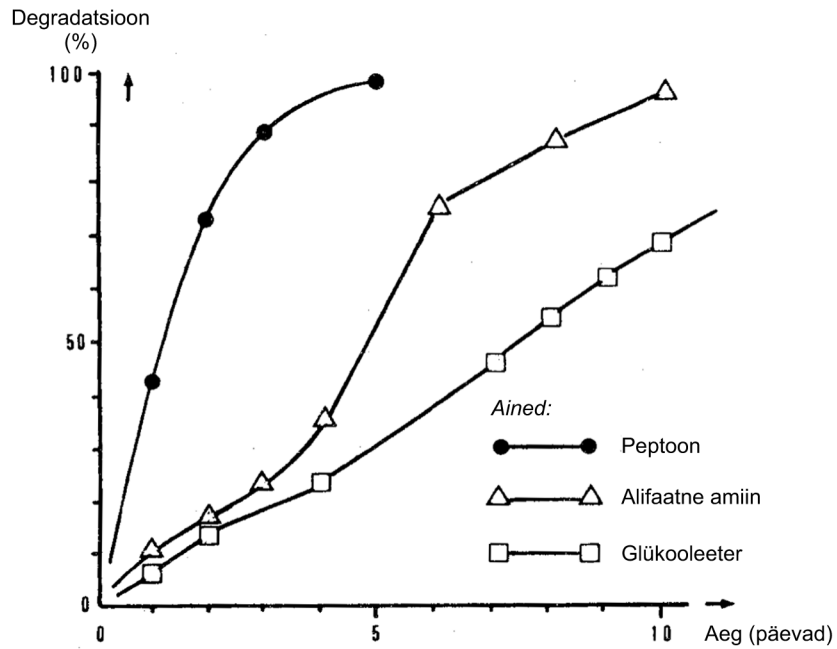
Katseae	Kontrollaine				Katseaine		
	Tühi LOS ⁽¹⁾ mg/l	LOS ⁽¹⁾ mg/l	LOS, puhas mg/l	Degradatsioon %	LOS ⁽¹⁾ mg/l	LOS, puhas mg/l	Degradatsioon %
0	—	—	300,0	—	—	390,0	—
3 tundi	4,0	298,0	294,0	2	371,6	367,6	6
1 päev	6,1	288,3	282,2	6	373,3	367,2	6
2 päeva	5,0	281,2	276,2	8	360,0	355,0	9
5 päeva	6,3	270,5	264,2	12	193,8	187,5	52
6 päeva	7,4	253,3	245,9	18	143,9	136,5	65
7 päeva	11,3	212,5	201,2	33	104,5	93,2	76
8 päeva	7,8	142,5	134,7	55	58,9	51,1	87
9 päeva	7,0	35,0	28,0	91	18,1	11,1	97
10 päeva	18,0	37,0	19,0	94	20,0	2,0	99

⁽¹⁾ Kolme mõõtmise keskmine näitaja.

▼B

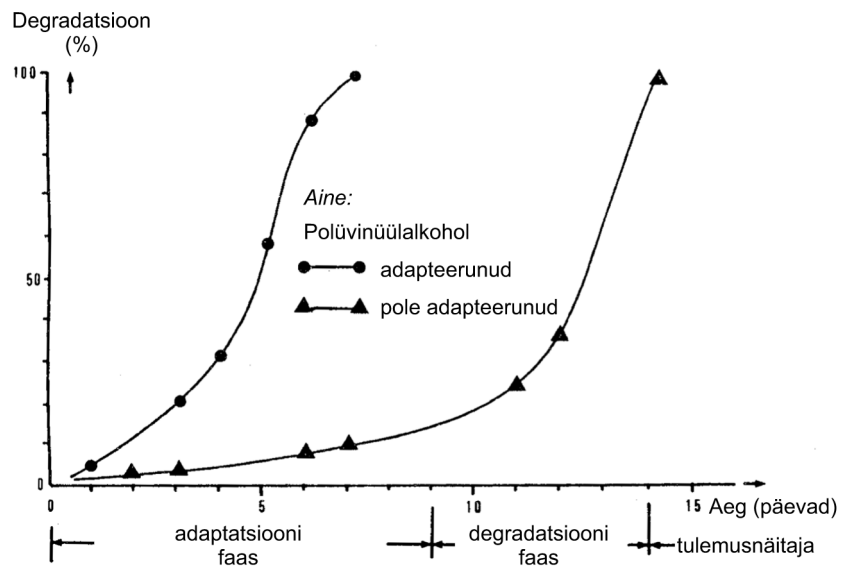
Joonis 1

Biodegradatsioonikõverate näited



Joonis 2

Aktiivmuda adaptatsiooni näited



▼ **M4****C.10. REOVEE AEROOBSE TÖÖTLEMISE SIMULATSIOONIKATSE:
C.10-A: AKTIIVMUDA – C.10-B: BOKILED****C.10-A: Aktiivmuda**

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 303 (2001). 1950. aastatel jõuti järeldusele, et hiljuti kasutusele võetud pindaktiivsed ained põhjustasid reoveepuhastites ja jõgedes liigset vahutamist. Neid ei kõrvaldatud täielikult aeroobse töötlemise käigus ja mõnel juhul need takistasid muude orgaaniliste ainete kõrvaldamist. Seepärast alustati mitmeid uuringuid selle kohta, kuidas pindaktiivseid aineid reoveest kõrvaldada ja kas tööstuses toodetud uusi kemikaale on üldse võimalik reoveest puhastada. Selleks kasutati mudelseadmeid, mis esindasid aeroobse bioloogilise reovee puhastamise kahte peamist tüüpi (aktiivmuda ja nõrgfiltrit kasutamine). Iga uue kemikaali jaotamine puhastusjaamadesse ja suuremahuliste puhastusjaamade jälgimine ei oleks olnud isegi kohalikul tasandil praktiline ning oleks olnud väga kulukas.

ESIALGSED KAALUTLUSED

Aktiivmuda

2. Aktiivmuda mudelühiku suurus on vahemikus 300 ml kuni ligikaudu 2 000 ml. Mõned neist imiteerisid lähedastelt täiemahulisi puhastusjaamu; neil olid mudasetepaagid, milles settinud muda pumbati tagasi aeratsioonibasseini, teistel ei olnud settimisnõusid, näiteks Swisher (1). Seadme suuruse valimisel on tehtud kompromiss; ühelt poolt peab see olema piisavalt suur, et seda oleks võimalik tulemuslikult mehaaniliselt käitada ja tagada piisav proovide kogus ilma käitamist mõjutamata, kuid teiselt poolt ei tohiks see olla nii suur, et selle rajamiseks oleks vaja liiga palju ruumi ja materjale.
3. Kaks laialdaselt ja rahuldavalt kasutatud seadmete vormi on Husmanni seadmed (2) ja poorse poti seadmed (3, 4), mida kasutati esmakordselt pindaktiivsete ainete uurimisel. Kõnealuseid seadmeid on kirjeldatud käesolevas katsemeetodis. Rahuldavalt on kasutatud ka muid seadmeid, vt näiteks Eckenfelder (5). Kõnealuse simulatsioonikatse tegemise jaoks vajalike suhteliselt suurte kulude ja jõupingutuste tõttu tehti sellega paralleelselt lihtsamad ja odavamad sõelkatsed, mis on nüüd esitatud käesoleva lisa peatüki C.4 meetodites C4.-A kuni C.4-F (6). Kogemused paljude pindaktiivsete ainete ja muude kemikaalidega on näidanud, et sõelkatses kergesti biolagunevaks osutunud ained lagundati ka simulatsioonikatsetes. Mõned sõelkatse järgi mittelagundatavaks klassifitseeritud ainetest olid loomuliku biolagundatavuse katsetes lagundatavad (käesoleva lisa peatükid C.12 (7) ja C.19 (8)), kuid ainult mõnda ainet viimati nimetatud rühmast lagundati simulatsioonikatsetes ning loomuliku biolagundatavuse katsetes mittelagunevaks klassifitseeritud kemikaalid ei lagunenu simulatsioonikatsetes (9, 10, 11).
4. Mõne eesmärgi saavutamiseks piisab ühe käitamistingimuste kogumiga tehtud simulatsioonikatsetest; katsete tulemused väljendatakse lahustunud orgaanilise süsiniku (DOC) või uuritava kemikaali kõrvaldamise protsendiga. Käesolevas katsemeetodis on esitatud sellise katse kirjeldus. Erinevalt käesoleva peatüki varasemast versioonist, kus kirjeldati ainult ühte tüüpi seadet sünteetilise reovee töötlemiseks, mis töötas ühendatud seadmete

▼M4

režiimis ja milles kasutati suhteliselt algeelist muda kõrvaldamise meetodit, on käesolevas tekstis esitatud mitmesuguseid variante. On kirjeldatud seadme tüübi, käitamisrežiimi, reovee ja muda kõrvaldamise alternatiive. Käesolev tekst vastab üsna täpselt standardis ISO 11733 (12) kirjeldatule, mida kontrolliti koostamise ajal hoolikalt, kuigi meetodi jaoks ei ole veel laboritevahelist võrdluskatset korraldatud.

5. Muude eesmärkide saavutamiseks peab uuritava kemikaali kontsentratsioon väljavoolus olema täpsemalt teada ja selleks vajatakse ulatuslikumat meetodit. Näiteks muda kõrvaldamise kiirust tuleb iga päev ja kogu katse ajal täpsemalt kontrollida ning seadmeid tuleb käitada mitmel erineval kõrvaldamise kiirusel. Täiemahulise meetodi jaoks tuleks katsed korraldada ka kahel või kolmel erineval temperatuuril: sellist meetodit on kirjeldanud Birch (13, 14) ja selle kokkuvõte on esitatud 6. liites. Praegused teadmised ei ole siiski piisavad, et otsustada, milline kineetilistest mudelitest on kemikaalide biolagunemisele reovee puhastamisel ja veekeskkonnas üldisemalt kohaldatav. Monod' kineetika kohaldamine, mis on näitena esitatud 6. liites, on piiratud kemikaalidega, mille sisaldus on vähemalt 1 mg/l, kuid mõne arvates on isegi see veel põhjendamata. Reoveele iseloomulikke kontsentratsioone täpsemalt peegeldavad katsed on esitatud 7. liites, kuid kõnealused katsed (ja 6. liites esitatud katsed) on esitatud liidetes ning neid ei ole avaldatud eraldi katsemeetoditena.

Filtrid

6. Palju vähem tähelepanu on pööratud nõrgfiltrimudelitele. See võib olla põhjustatud asjaolust, et need on kogukamad ja vähem kompaktsed kui aktiivmudapuhasti mudelid. Gerike *et al.* töötasid välja nõrgfiltrimisseadmed ja käitasid neid ühendatud režiimis (15). Kõnealused filtrid olid suhteliselt suured (kõrgus 2 m; maht 60 l) ja iga filtri jaoks oli vaja 2 l/h reovett. Baumann *et al.* (16) simuleerisid nõrgfiltreid, sisestades 1 m torudesse (mille siseläbimõõt oli 14 mm) nn polüestervillaribad, mida oli 30 minuti vältel immutatud kontsentreeritud aktiivmudaga. Uuritav kemikaal, mis oli ainus süsinikuallikas mineraaloolade lahuses, sisestati püstsuunalisse torusse ja biolagundamist hinnati lahustunud orgaanilise süsiniku määramisega väljavoolus ning CO₂ mõõtmisega eralduvas gaasis.
7. Biofiltreid simuleeriti teise meetodi abil (15); horisontaalsuuna suhtes väikse nurga all olevate pöörlevate torude sisepindadele viidi reovett (ligikaudu 250 ml/h) koos uuritava kemikaaliga või ilma selleta ning kogutud väljavoolu analüüsiti lahustunud orgaanilise süsiniku ja/või konkreetse uuritava kemikaali määramiseks.

KATSE PÕHIMÕTE

8. Käesolev meetod on kavandatud selleks, et määrata vees lahustuvate orgaaniliste kemikaalide kõrvaldamist ning esmast ja/või täielikku biolagundamist aeroobsete mikroorganismide poolt pidevalt käitatavas katsesüsteemis, millega simuleeritakse aktiivmuda protsessi. Lihtsasti biolagundatav orgaaniline kasvukeskkond ja orgaaniline uuritav kemikaal on mikroorganismidele energia- ja süsinikuallikateks.
9. Kaks pidevalt käitatavat katseseadet (aktiivmudapuhastid või poorsed potid) töötavad paralleelselt ühesugustel tingimustel, mis valitakse katse eesmärgi kohaselt. Keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg on tavaliselt kuus tundi ja keskmine muda kasutamise aeg (muda retentsiooniaeg) on kuus kuni kümme päeva. Muda kõrvaldatakse ühega kahest meetodist. Uuritavat kemikaali lisatakse ainult ühte seadmetest sissevoolu (orgaaniline kasvukeskkond) kaudu tavaliselt kontsentratsiooniga vahemikus 10–20 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku. Teist seadet kasutatakse kontrollseadmena, et määrata orgaanilise kasvukeskkonna biolagunemist.

▼M4

10. Väljavooludest võetakse sageli proove ja määratakse nendes (eelistatult) lahustunud orgaaniline süsinik või siis keemiline hapnikutarve; selle seadme väljavoolust, kuhu lisatakse uuritavat kemikaali, määratakse spetsiifilise analüüsimeetodiga uuritava kemikaali kontsentratsioon (kui see on nõutav). Katse- ja kontrollseadme väljavoolus määratud lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni või keemilise hapnikutarbe erinevus on eeldatavasti põhjustatud uuritavast kemikaalst või selle orgaanilistest metaboliitidest. Seda erinevust võrreldakse lisatud uuritavast kemikaalst põhjustatud lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooniga või keemilise hapnikutarbega sissevoolus, et määrata uuritava kemikaali kõrvaldamise määr.
11. Biolagunemist võib tavaliselt eristada bioadsorptsioonist nii, et graafikul uuritakse hoolikalt, kuidas kõrvaldamismäär sõltub ajast, ning seda võib tavaliselt kinnitada kiire biolagundatavuse katsega, kasutades selle seadme aklimatiseeritud inokulumi, kuhu lisatakse uuritavat kemikaali.

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

12. Tulemuste õigesti tõlgendamiseks on vaja teada uuritava kemikaali puhtust, vees lahustuvust, lenduvus- ja adsorptsiooniomadusi. Tavaliselt ei ole lenduvaid ja lahustumatuid kemikaale võimalik katsetada ilma erimeetmeid võtmata (vt 5. liide). Samuti on vaja teada keemilist struktuuri või vähemalt empiirilist valemit, et arvutada teoreetilisi väärtusi ja/või kontrollida parameetrite mõõdetud väärtusi, näiteks teoreetilist hapnikutarvet (ThOD), lahustunud orgaanilist süsinikku (DOC) ja keemilist hapnikutarvet (COD).
13. Sobivate katsekontsentratsioonide valimiseks võivad vajalikud olla andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta mikroorganismidele (vt 4. liide) ning vähese biolagundatavuse väärtuste õigeks tõlgendamiseks on sellised andmed hädavajalikud.

KÜNNISVÄÄRTUSED

14. Käesoleva pindaktiivsete ainete esmase biolagundamise simulatsioonikatse (kinnitava katse) esimese rakendamise järel nõutakse konkreetse kemikaali kõrvaldamist rohkem kui 80 % ulatuses, et pindaktiivset ainet võiks lubada turule. Kui 80 % künniseni ei jõuta, võib rakendada kõnealust simulatsioonikatset (kinnitavat katset) ja pindaktiivset ainet võib turustada ainult juhul, kui sellega kõrvaldatakse rohkem kui 90 % konkreetsest kemikaalst. Kemikaalide puhul üldiselt ei teki lubamise/mittelubamise küsimust ja saavutatud kõrvaldamise protsentväärtust võib kasutada tõenäolise keskkonnakontsentratsiooni ligikaudsetes arvutustes, mida kasutatakse kemikaalide põhjustatud ohu hindamiseks. Tulemused järgivad üldjuhul põhimõtet „kõik või mitte midagi”. Puhaste kemikaalide mitmes uuringus leiti, et olulises ulatuses biolagunevatest kemikaalidest rohkem kui kolme neljandiku puhul on lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr > 90 % ning sellistest kemikaalidest rohkem 90 % puhul on see > 80 %.
15. Kõnealuses katses kasutatud kontsentratsioonidel (ligikaudu 10 mg C/l) esineb reeves suhteliselt väheseid kemikaale (näiteks pindaktiivseid aineid). Mõned kemikaalid võivad sellisel kontsentratsioonil inhibeerida ja mõne muu kemikaali kõrvaldamise kineetika võib väikesel kontsentratsioonil olla erisugune. Lagundamist oleks võimalik täpsemalt hinnata, kui kasutada muudetud meetodeid ja uuritava kemikaali realistlikult väikest kontsentratsiooni ning selliselt kogutud andmeid saaks kasutada kineetiliste konstantide arvutamiseks. Vajalikke katsemeetodeid ei ole siiski veel täielikult valideeritud ja biolagundamisreaktsioone kirjeldavad kineetilised mudelid ei ole veel kindlaks tehtud (vt 7. liide).

▼ **M4****VÖRDLUSKEMIKAALID**

16. Katse korraliku tegemise tagamiseks on kasulik kemikaalide uurimise ajal aeg-ajalt katsetada kemikaale, mille käitumine on teada. Sellised kemikaalid on näiteks adipiinhape, 2-fenüülfenool, 1-naftool, difeenhape, 1-naftoehape jne (9, 10, 11).

KATSETULEMUSTE REPRODUTSEERITAVUS

17. Simulatsioonikatsete uuringute kohta on olnud märksa vähem teateid kui kiire biolagundatavuse katsete kohta. 80 % või rohkem lagundatavate uuritavate kemikaalide puhul on (samaaegsete) paralleelproovide reprodutseeritavus hea (10–15 % piires), kuid vähem lagundatavate kemikaalide puhul on hajuvus suurem. Üheksanädalases lagundamiskatses on eri juhtudel registreeritud ka mõne piiripealse kemikaaliga väga erinevaid tulemusi (näiteks 10 %, 90 %).
18. Kahte tüüpi seadmetega saadud tulemustes on leitud vähe erinevusi, kuid mõne kemikaali puhul toimub olmereovee kasutamisel ulatuslikum ja järjepidevam lagunemine kui (OECD) sünteetilise reovee puhul.

KATSEMEETODI KIRJELDUS**Seadmed***Katsesüsteem*

19. Ühe uuritava kemikaali katsetamise süsteem koosneb katseseadmest ja kontrollseadmest, kuid vaid spetsiifiliste analüüside tegemisel (esmane biolagundamine) on vaja ainult katseseadet. Mitme katseseadme kohta, milles uuritakse kas üht ja sama kemikaali või erinevaid kemikaale, võib kasutada ainult ühte kontrollseadet. Ühendatud seadmete korral (3. liide) peab igal katseseadmel olema oma kontrollseade. Katsesüsteem võib olla kas aktiivmudapuhasti mudel, Husmanni seade (1. liite joonis 1) või poorne pott (1. liite joonis 2). Mõlemal juhul on sissevoolu ja väljavoolu jaoks vaja piisava suurusega säilitusnõusid ning pumpasid, et doseerida sissevoolu, kas eraldi või segatult uuritava kemikaali lahusega.
20. Iga aktiivmudapuhasti seade koosneb aeratsiooninõust, mille maht on teada, ligikaudu 3 liitrit aktiivmuda, ja separaatorist (teiseseist selitist), mille maht on ligikaudu 1,5 liitrit. Mahte võib teatavas ulatuses separaatori kõrguse kohandamisega muuta. Eri suurusega nõude kasutamine on lubatud, kui neid käitatakse võrreldava hüdraulilise koormusega. Kui katseruumi temperatuuri hoidmine soovitud vahemikus ei ole võimalik, soovitatakse kasutada veesärgiga nõusid, mille vee temperatuur on reguleeritav. Aktiivmuda tagasi viimiseks separaatorist aeratsiooninõusse kasutatakse suruõhupumpa või doseerimispumpa, mis töötab kas pidevalt või korrapäraste ajavahemike järel.
21. Poorse poti süsteem koosneb sisemisest poorsest silindrist, mille koonuseline alaosa asub mõnevõrra suuremas sama kujuga nõus, mis on valmistatud vett mitte läbi laskvast plastmaterjalist. Poorse nõu jaoks on sobiv materjal poorne polüetüleen, mille pooride maksimaalne suurus on 90 µm ja paksus 2 mm. Muda eraldamine töödeldud orgaanilisest kasvukeskkonnast toimub poorse seina diferentseeritud läbimise teel. Väljavool koguneb ringikujulisse alasse, kust see kandub ülevoolamise teel kogumisnõusse. Settimist ei toimu ja muda seega tagasi ei suunata. Kogu süsteemi võib paigutada termostaadiga reguleeritavasse vesivanni. Poorsed potid ummistuvad algetappides ja võivad üle voolata. Sel juhul asendage poorne vooderdis puhtaga: kandke

▼ **M4**

kõigepealt muda potist sifooniga puhtasse ämbrisse ning kõrvaldage ummistunud vooderdis. Pärast mitteläbilaskva välissilindri puhtakspühkimist pange sisse puhas vooderdis ja kandke muda tagasi potti. Ummistunud vooderdise külge jäänud muda tuleb samuti hoolikalt maha kraapida ja tagasi potti kanda. Puhastage ummistunud pott kõigepealt peene veejoaga, et eemaldada külgejäänud muda, ning leotage potti siis lahjas naatriumhüpokloriti lahuses ja seejärel vees ning loputage siis põhjalikult veega.

22. Muda aereerimiseks mõlema süsteemi aeratsiooninõus tuleb kasutada sobivat meetodit, näiteks klaasfilteraeraatoreid (aeratsioonielement) ja suruõhku. Õhku puhastatakse vajaduse korral, suunates selle läbi sobiva filtri ja kasutades vesipuhastust. Läbi süsteemi tuleb suunata piisavas koguses õhku, et säilitada aeroobseid tingimusi ja hoida mudahelbed katse vältel kogu aeg hõljuvas olekus.

Filtrimiseseade või tsentrifuug

23. Seade proovide filtrimiseks, milles on sobiva poorisuurusega (ava nominaal-läbimõõt 0,45 µm) membraanfiltrid, mis adsorbeerivad lahustuvad orgaanilised kemikaalid ja millest vabaneb võimalikult vähe orgaanilist süsinikku. Kui kasutatakse filtreid, millest vabaneb orgaanilist süsinikku, tuleb filtreid hoolikalt pesta kuuma veega, et eemaldada väljahutatav orgaaniline süsinik. Selle asemel võib kasutada tsentrifuugi, mis tagab 40 000 m/s².

Analüüiseseadmed

24. Seadmed, mis on vajalikud järgmise kindlaksmääramiseks:
- lahustunud orgaaniline süsinik, orgaanilise süsiniku kogusisaldus või keemiline hapnikutarve;
 - konkreetne kemikaal, kui nõutakse selle määramist;
 - hõljuvaine, pH, hapniku kontsentratsioon vees;
 - temperatuur, happelisus ja leeliselisus;
 - ammonium, nitrit ja nitraat, kui katse tehakse nitrifikatsiooni tingimustes.

Vesi

25. Kraanivesi, mis sisaldab vähem kui 3 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku. Määrake leeliselisus, kui see ei ole teada.
26. Deioniseeritud vesi, mis sisaldab vähem kui 2 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku.

Orgaaniline kasvukeskkond

27. Orgaanilise kasvukeskkonnana võib kasutada sünteetilist reovett, olmereovett või nende segu. On tõendatud (11, 14), et ainult olmereovee kasutamise puhul saadakse sageli suurem lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise protsent ning sellest saab kõrvaldada ja biolagundada mõnda kemikaali, mis ei ole OECD sünteetilise reovee kasutamisel biolagundatavad. Ka pidev või korrapärane olmereovee lisamine stabiliseerib sageli aktiivmuda, sh võimaldab üliolulise omadusena head settimist. Seega on soovitatav kasutada olmereovett. Igas uues orgaanilise kasvukeskkonna partiis tuleb mõõta lahustuva orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kontsentratsioon. Orgaanilise kasvukeskkonna happelisus või leeliselisus peaks olema teada. Kui orgaanilise kasvukeskkonna happelisus või leeliselisus on vähene, võib see vajada sobiva puhvri lisamist (naatriumvesinikkarbonaat või kaaliumdi-vesinikfosfaat), et säilitada katse ajal aeratsiooninõus pH ligikaudu 7,5 ± 0,5. Lisatava puhvri kogus ja selle lisamise aeg tuleb igal eraldi juhul kindlaks määrata. Kui segusid kasutatakse kas pidevalt või aeg-ajalt, tuleb segu lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) hoida ligikaudu püsivana, näiteks veega lahjendamise teel.

▼ **M4***Sünteeiline reovesi*

28. Ühes liitris kraanivees lahustatakse: 160 mg peptooni, 110 mg lihaekstrakti, 30 mg karbamiidi, 28 mg veevaba dikaaliumvesinikfosfaati (K_2HPO_4), 7 mg naatriumkloriidi (NaCl), 4 mg kaltsiumkloriidihüdraati ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), 2 mg magneesiumsulfaatheptahüdraati ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$). See OECD sünteiline reovesi on näidis ja selle keskmine lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon sissevoolus on ligikaudu 100 mg/l. Alternatiivselt võib kasutada muid koostisi, millel on ligikaudu sama lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon ja mis on pärisreoveega sarnasemad. Kui on vajalik väiksema kontsentratsiooniga sissevool, lahjendage sünteetilist reovett näiteks 1 : 1 kraaniveega, et saada kontsentratsioon ligikaudu 50 mg/l. Kõnealune väiksema kontsentratsiooniga sissevool võimaldab nitritiseerivate organismidel paremini kasvada ja seda muutust tuleks kasutada juhul, kui on vajalik uurida nitritiseerivate reoveepuhastite simuleerimist. Kõnealuse sünteetilise reovee kontsentratsiooni võib valmistada destilleeritud veega ja säilitada kuni ühe nädala temperatuuril 1 °C. Enne kasutamist lahjendatakse seda kraaniveega. (See kasvukeskkond ei ole rahuldav, näiteks lämmastiku kontsentratsioon on väga suur ja süsinikusisaldus on suhteliselt väike, kuid kasvukeskkonna parandamiseks on soovitatud üksnes lisada puhvrina suuremas koguses fosfaati ja rohkem peptooni).

Olmereovesi

29. Kasutage värskelt settinud reovett, mida kogutakse iga päev peamiselt olmereovett töötlevast veepuhastuskäitisest. Seda tuleks koguda enne esmast settimist esmase settimise paagi ülevoolu kanalist või aktiivmudapuhasti sissevoolust ja see peaks üldiselt olema ilma suurte osakesteta. Seda reovett saab enne kasutamist hoida mitu päeva temperatuuril ligikaudu 4 °C (kuid üldiselt ei tohiks seda hoida üle seitsme päeva), kui tõendatakse, et lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus (või keemiline hapnikutarve) ei ole hoidmise ajal oluliselt vähenenud (s.o vähem kui 20 %). Süsteemi häirimise vähendamiseks tuleks igas uues partiiis viia lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) enne kasutamist sobivale konstantsele väärtusele näiteks kraaniveega lahjendamise teel.

Aktiivmuda

30. Koguge inokulatsiooniks aktiivmuda hästi käitatud reoveepuhasti või peamiselt olmereovee puhastamiseks kasutatava laborisuuruses aktiivmudaseadme aeratsiooninõust.

Uuritava kemikaali põhilahused

31. Kui kemikaal on piisavalt lahustuv, valmistage sobiva kontsentratsiooniga (näiteks 1–5 g/l) põhilahus deioniseeritud vees või sünteetilise reovee mineraalses osas (lahustumatute ja lenduvate kemikaalide korral vt 5. liide). Määrake kindlaks põhilahuse lahustunud orgaaniline süsinik ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus ning korrake mõõtmisi iga uue partii puhul. Kui lahustunud orgaanilise süsiniku ja orgaanilise süsiniku kogusisalduse erinevus on suurem kui 20 %, kontrollige uuritava kemikaali lahustuvust vees. Määrake põhilahuses lahustunud orgaanilise süsiniku või mõõdetud uuritava kemikaali kontsentratsioon spetsiifilise analüüsi abil ja võrrelge nimiväärtusega, et näha, kas määramise saagis on piisavalt hea (tavaliselt võib eeldada > 90 %). Veenduge (eelkõige dispersiooni korral), kas lahustunud orgaanilist süsinikku saab kasutada analüüsiparameetrina või tuleb kasutada ainult spetsiifilist analüüsimeetodit, millega saab määrata uuritavat kemikaali. Dispersiooni puhul on vaja proovid tsentrifugida. Iga uue partii puhul määrake lahustunud orgaaniline süsinik, keemiline hapnikutarve või uuritav kemikaal spetsiifilise analüüsimeetodiga.

▼ **M4**

32. Määrake põhilahuse pH. Äärmuslikud väärtused osutavad, et kemikaali lisamine võib mõjutada aktiivmuda pH-d katsesüsteemis. Sel juhul neutraliseerige põhilahus väikse koguse anorgaanilise happe või aluse lisamisega, et pH oleks $7 \pm 0,5$, kuid vältige uuritava kemikaali sadestamist.

KATSE KÄIK

33. Siin on kirjeldatud aktiivmudapuhasti katset; poorse poti süsteemi puhul tuleb seda mõnevõrra kohandada.

Inokulumi valmistamine

34. Inokuleerige katsesüsteem katse alguses kas aktiivmuda või väikesekontsentratsioonilise mikroorganismide inokulumiga. Hoidke inokulumi toatemperatuuril aereerituna kuni selle kasutamiseni ja kasutage ee ära 24 tunni jooksul. Aktiivmuda kasutamise korral võtke aktiivmuda proov tõhusalt käitatava bioloogilise reoveepuhasti aeratsiooninõust või labori puhastist, milles käideldakse peamiselt olmereovett. Kui simuleeritakse nitrifitseerivaid tingimusi, võtke muda nitrifitseerivast reoveepuhastist. Määrake kindlaks hõljuvaine kontsentratsioon ja vajaduse korral suurendage muda settimise teel selle kontsentratsiooni, et katsesüsteemi lisatav maht oleks minimaalne. Kuivaine lähtekontsentratsioon peab olema ligikaudu 2,5 g/l.
35. Teisel juhul kasutage inokulumina väljavoolu bioloogilisest olmereovee puhastist koguses 2 ml/l kuni 10 ml/l. Võimalikult paljude eri bakteriliikide saamiseks võib olla kasulik eri allikatest, näiteks pinnaveest, saadud inokulumide lisamine. Sel juhul hakkab aktiivmuda katsesüsteemis arenema ja paljunema.

Orgaanilise kasvukeskkonna doseerimine

36. Hoolitsege, et sisse- ja väljavoolunõud ning sissevoolunõust väljuvad ja väljavoolunõusse sisenevad torud on korralikult puhastatud, et seal katse alguses ja kogu katse vältel ei kasvaks mikroobe. Seadke katsesüsteem üles ruumis, mille temperatuuri saab reguleerida (üldiselt vahemikus 20–25 °C) või kasutage veesärgiga katseseadmeid. Valmistage piisav kogus vajaminevat orgaanilist kasvukeskkonda (punktid 27–29). Täitke kõigepealt aeratsiooninõu ja separaator orgaanilise kasvukeskkonnaga ning lisage inokulum (punktid 34 ja 35). Alustage aereerimist nii, et muda jääks hõljuvasse ja aeroobsesse olekusse, ning alustage sissevooluvee doseerimist ja settinud muda ringlussevõttu. Doseerige hoiunõust orgaanilist kasvukeskkonda katse- ja kontrollseadmete aeratsiooninõudesse (punktid 20, 21) ning koguge vastavad väljavoolud samalaadsetesse kogumisnõudesse. Tavapärase kuuettunnise hüdraulilise retentsioonaja saavutamiseks pumbatakse orgaanilist kasvukeskkonda juurde kiirusega 0,5 l/h. Selle kiiruse kontrollimiseks mõõtki iga päev doseeritud orgaanilise kasvukeskkonna kogus, märkides üles kasvukeskkonna koguse vähenemise hoiunõudes. Kemikaalide vahelduva vabanemise ja koormuse järsu suurenemise mõju uurimiseks on vaja kasutada muid doseerimisrežiime.
37. Kui orgaaniline kasvukeskkond valmistatakse kasutamiseks rohkem kui ühe päeva jooksul, on vaja see jahutada temperatuurini umbes 4 °C või rakendada muid asjakohaseid säilitusmeetodeid, et vältida mikroobide kasvu ja biolagunemist väljaspool katseseadet (punkt 29). Kui kasutatakse sünteetilist reovett, võib valmistada kontsentreeritud põhilahuse (näiteks tavapärasest kontsentratsioonist kümme korda suurema kontsentratsiooniga, punkt 28) ja seda säilitada ligikaudu 4 °C juures. Selle põhilahuse võib enne kasutamist hoolikalt segada vajaliku koguse kraaniveega; teise võimalusena võib seda ka otse katsenõusse pumbata, pumbates eraldi juurde vajaliku koguse kraanivett.

▼ **M4***Uuritava kemikaali doseerimine*

38. Lisage vajalikus koguses uuritava kemikaali põhilahust (punkt 31) sisse-voolu vee nõusse või doseerige seda eraldi pumba abil otse aeratsiooninõusse. Sissevoolu tavaline keskmine kontsentratsioon peaks olema 10–20 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku ja ülempiir ei tohiks olla rohkem kui 50 mg/l. Kui uuritav kemikaal vees hästi ei lahustu või võib avaldada toksilisust, vähendage katsekontsentratsiooni väärtusele 5 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku või veel väiksemale kontsentratsioonile, aga seda ainult juhul, kui on olemas asjakohane spetsiifiline analüüsimeetod ja seda kasutatakse (vees halvasti lahustuvat dispersiooni moodustavat uuritavat kemikaali võib lisada doseerimise erimeetodite abil, vt 5. liide).
39. Alustage uuritava kemikaali lisamist pärast ajavahemikku, mille jooksul süsteem on stabiliseerunud ja kõrvaldab tõhusalt orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilist süsinikku (ligikaudu 80 %). Enne uuritava kemikaali lisamist on tähtis kontrollida, et kõik seadmed töötaksid ühevõrra tõhusalt; kui need ei tööta ühevõrra tõhusalt, on üldiselt kasulik eri mudad kokku segada ja lisada eri seadmetesse uuesti võrdsed kogused muda. Kui kasutatakse aktiivmuda inokulumi (ligikaudu) 2,5 g/l (kuivkaal), võib uuritava kemikaali lisada katse alguses, kuna algusest peale üha suuremate koguste otse lisamine võimaldab aktiivmudal uuritava kemikaaliga paremini kohanedada. Olenemata uuritava kemikaali lisamise viisist, soovitatakse korrapäraste ajavahemike järel mõõta voolukiirust ja/või lahuste mahtu hoiu-*nõu(de)s*.

Aktiivmuda käsitlemine

40. Aktiivmuda tahkete osakeste kontsentratsioon stabiliseerub üldiselt katse jooksul vahemikus 1–3 g/l (kuivkaal), olenemata kasutatud inokulumist, kuid sõltuvalt orgaanilise kasvukeskkonna kvaliteedist ja kontsentratsioonist, käitamistingimustest, mudas olevate mikroorganismide laadist ning uuritava kemikaali mõjust.
41. Määrake aeratsiooninõudes hõljuvaine sisaldus vähemalt iga nädal ja kõrvaldage liigne muda, et hoida kontsentratsioon vahemikus 1 g/l kuni 3 g/l (kuivkaal) või hoidke püsivana muda keskmist kasutusaega, üldiselt vahemikus 6–10 päeva. Kui muda retentsioonijaks valitakse näiteks kaheksa päeva, siis eemaldage iga päev 1/8 aeratsiooninõu aktiivmuda kogusest ja kõrvaldage see. Tehke seda iga päev või eelistatavalt automaatselt vahelduvalt sisselülitava pumba abil. Hõljuvaine kontsentratsiooni püsivana või kitsastes piirides hoidmisega ei säilitata püsivat muda retentsiooniaega, mis on käitamisinäitaja, mis määrab uuritava kemikaali kontsentratsioon väljavoolus.
42. Eemaldage kogu katse vältel vähemalt kord päevas aeratsiooninõu ja separaatori seinte külge jäänud muda, et viia see tagasi suspensiooni. Kontrollige korrapäraselt kõiki torusid ja torustikku ning puhastage neid, et vältida biokile teket. Võtke separaatorist settinud muda aeratsiooninõus ringlusse, eelistatavalt vahelduva pumpamise teel. Poorse poti süsteemis ringlussevõttu ei toimu, kuid veenduge, et olete enne nõus mahu märkimisväärset suurenemist pannud sisse puhtad sisemised potid (punkt 21).
43. Husmanni puhasti seadmetes võib muda halvasti settida ja võivad tekkida mudakaod. Seda on võimalik vältida, kui teha katse- ja kontrolliseadmetes paralleelselt järgmist:
- korrapäraste ajavahemike järel, näiteks iga nädal, võib lisada värsket muda või flokulanti (näiteks igasse nõusse 2 ml FeCl₃ lahust kontsentratsiooniga 50 g/l), kuid tuleb veenduda, et FeCl₃ ei põhjusta uuritava kemikaali reaktsiooni või sadestumist;

▼ **M4**

- suruõhupumba võib asendada peristaltilise pumbaga, mis võimaldab kasutada sissevooluga ligikaudu võrdväärset muda ringlussevõtu voolu ja võimaldab luua settinud mudas anaeroobse ala (suruõhupumba geomeetria tõttu on tagasisuunatud muda minimaalne voolukiirus ligikaudu 12 korda suurem kui sissevoolu kiirus);
- muda võib pumbata separaatorist aeratsiooninõusse vahelduvalt sisselülituva pumbaga (näiteks 5 minutit iga 2,5 tunni tagant, et võtta muda ringlusse kiirusega 1–1,5 l/h);
- vahutamiskadude vältimiseks võib kasutada minimaalsel kontsentratsioonil mittemürgist vahutamistavast ainet (näiteks silikoonõli);
- õhku võib separaatoris juhtida läbi muda lühikeste järskude pursestena (näiteks 10 sekundit kord tunnis);
- aeratsiooninõusse võib teatava ajavahemiku järel doseerida orgaanilist kasvukeskkonda (näiteks 3–10 minutit iga tund).

Proovide võtmine ja analüüsimine

44. Korrapärase ajavahemike järel tuleb aeratsiooninõudes mõõta aktiivmuda lahustunud hapniku kontsentratsiooni, temperatuuri ja pH-d. Tuleb veenduda, et alati on saadaval piisavalt hapnikku (> 2 mg/l) ja et temperatuuri hoitakse nõutavas vahemikus (üldiselt 20–25 °C). Hoidke pH-d vahemikus $7,5 \pm 0,5$, doseerides aeratsiooninõusse või sissevoolu väikeses koguses anorgaanilist alust või hapet või suurendades orgaanilise kasvukeskkonna puhvervusvõimet (vt punkt 27). Nitrititeerimise käigus tekib hapet, 1 mg N oksüdeerumisel tekib kogus, mis on ligikaudu võrdväärne kogusega 7 mg CO_3^- . Mõõtmiste sagedus oleneb mõõdetavast parameetrist ja süsteemi stabiilsusest ning võib varieeruda ühest korrast päevas kuni ühe korrani nädalas.
45. Kontroll- ja katsenõude sissevoolus tuleb mõõta lahustunud orgaanilist süsinikku või keemilist hapnikutarvet. Katse sissevooluvees tuleb spetsiifilise analüüsiga mõõta uuritava kemikaali kontsentratsiooni või seda tuleb hinnata põhilahuse kontsentratsiooni (punkt 31), kasutatud mahu ja katseesadmesse doseeritud reovee koguse põhjal. Uuritava kemikaali kontsentratsiooni on soovitatav arvutada, et vähendada kontsentratsioonandmete varieerumist.
46. Võtke kogutud väljavoolust vajalikud proovid (näiteks 24 tunni koondproovid) ja filtrige need läbi membraani, mille poori suurus on 0,45 μm , või tsentrifuugige need 40 000 m/s^2 juures 15 minutit. Kui filtrida on raske, tuleb kasutada tsentrifuugimist. Määrake lahustunud orgaaniline süsinik või keemiline hapnikutarve vähemalt kaks korda, et mõõta täielikku biolagunemist ja (kui seda nõutakse) uuritava kemikaali spetsiifilise analüüsiga esmast biolagunemist.
47. Keemilise hapnikutarbe kasutamine võib põhjustada analüüsiprobleeme väikestel kontsentratsioonidel ja seega soovitatakse seda ainult juhul, kui kasutatakse piisavalt suurt katsekonsentratsiooni (ligikaudu 30 mg/l). Tugevasti adsorbeeruva kemikaali puhul soovitatakse samuti mõõta mudas adsorbeeritud kemikaali, kasutades spetsiifilist uuritava kemikaali analüüsi meetodit.
48. Proovivõtu sagedus oleneb katse eeldatavast kestusest. Soovitatav sagedus on kolm korda nädalas. Kui seadmed töötavad tõhusalt, laske süsteemil pärast uuritava kemikaali lisamist 1–6 nädalat kohaneda, et saavutada kohanemise statsionaarne olek. Platoofaasis (punkt 59), mis kestab tavaliselt kolm nädalat, mõõtkatsetulemuse hindamiseks, eelistatavalt vähemalt 15 kehtivat väärtust. Katse võib lõpetada, kui on jõutud piisava kõrvaldamise määrani (näiteks $> 90\%$) ja saadud kõnealused 15 väärtust, mis väljendavad kolme nädala jooksul igal tööpäeval tehtud analüüse. Katse ei tohiks pärast uuritava kemikaali lisamist üldiselt kesta üle 12 nädala.

▼ **M4**

49. Kui muda nitrifitseerib ja kui uuritakse kemikaali mõjusid nitrifitseerimisele, tuleb katse- ja kontrollseadmete väljavoolu proovides mõõta vähemalt kord nädalas ammooniumi- ja/või nitriti- ja nitraadisaldust.
50. Kõik analüüsid ja eelkõige lämmastikusisalduse määramine tuleks teha võimalikult kiiresti. Kui analüüsid tuleb edasi lükata, säilitage proove tiheidalt suletud pudelis pimedas ja temperatuuril ligikaudu 4 °C. Kui proove tuleb säilitada kauem kui 48 tundi, siis kasutage säilitamiseks sügavkülmutamist, hapestamist (näiteks 1 liitri kohta 10 ml väävelhappelahuse (400 g/l) lisamisega) või asjakohase mürgise aine lisamist (näiteks 1 liitri kohta 20 ml elavhõbe(II)kloriidi lahuse (10 g/l) lisamisega). Kontrollige, et säilitamise meetod ei mõjutaks analüüsi tulemusi.

Katseseadmete ühendamine

51. Kui kasutatakse ühendamist (3. liide), siis vahetage iga päev sama kogus aktiivmuda (150 ml kuni 1 500 ml 3 liitrit lahust sisaldavate aeratsiooninõude puhul) katseseadme ja selle kontrollseadme aeratsiooninõude vahel. Kui uuritav kemikaal adsorbeerub tugevasti muda külge, siis vahetage ainult separaatorite supernatanti. Mõlemal juhul kasutage katsetulemuste arvutamiseks parandustegurit (punkt 55).

ANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

52. Arvutage uuritava kemikaali lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsent igal mõõtmise ajal järgmise võrrandi abil:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_0)}{C_s} \times 100$$

kus

D_t = lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsent ajal t

C_s = uuritava kemikaali põhjustatud lahustunud orgaaniline süsinik või keemiline hapnikutarve sissevoolu vees, eelistatavalt hinnatud põhilahuse järgi (mg/l)

E = katse väljavoolus ajal t mõõdetud lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe näitaja (mg/l)

E_0 = kontrollseadme väljavoolus ajal t mõõdetud lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe näitaja (mg/l)

53. Kontrollseadme orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise määr on kasulik teave katse ajal aktiivmuda biolagundava aktiivsuse hindamiseks. Arvutage kõrvaldamise protsent järgmise võrrandi alusel:

$$D_B = \frac{C_M - E_0}{C_M} \times 100$$

kus

D_B = kontrollseadme orgaanilises kasvukeskkonnas lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsent ajal t

C_M = orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaaniline süsinik või keemiline hapnikutarve kontrollseadme sissevoolu vees (mg/l)

▼M4

Soovi korral võite arvutada orgaanilise kasvukeskkonna ja katseseadmes uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsendi järgmise võrrandi abil:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

kus

D_T = katse kogu sissevooluvee lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise protsent

C_T = katse kogu sissevooluvee või põhilahuse alusel arvatud lahustunud orgaaniline süsinik või keemiline hapnikutarve (mg/l)

54. Kui mõõdetakse uuritava kemikaali kõrvaldamist, arvutage see igal hindamisajal spetsiifilise analüüsi meetodiga järgmise võrrandi abil:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

kus

D_{ST} = uuritava kemikaali esmase kõrvaldamise protsent ajal t

S_i = uuritava kemikaali mõõdetud või hinnatud kontsentratsioon katse sissevooluvees (mg/l)

S_e = uuritava kemikaali mõõdetud kontsentratsioon katse väljavooluvees ajal t (mg/l)

55. Kui kasutatakse ühendatud režiimi, siis kompenseerige uuritava kemikaali lahjenemine aeratsiooninõus muda vahetuse tõttu parandusteguri abil (vt 3. liide). Kui kasutati keskmist hüdraulilist retentsiooniaega kuus tundi ja aeratsiooninõus poole aktiivmuda mahu vahetamist, tuleb igapäevaseid määratud kõrvaldamise näitajaid (D_t , punkt 52) parandada, et leida tegelik uuritava kemikaali kõrvaldamise määr D_{tc} järgmise võrrandiga:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Katsetulemuste esitamine

56. Koostage kõrvaldamisprotsendi D_t (või D_{tc}) ja D_{st} (kui see on leitud) ajast sõltuvuse graafik (vt 2. liide). Uuritava kemikaali (kui niisuguse või lahustunud orgaanilise süsinikuna) kõrvaldamise kõvera kuju alusel võib teha järeldusi kõrvaldamisprotsessi kohta.

Adsorptsioon

57. Kui uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr on suur kohe katse algusest peale, siis kõrvaldatakse uuritavat kemikaali tõenäoliselt aktiivmuda tahketesse osakestesse adsorbeerimise teel. Seda on võimalik tõendada adsorbeerunud uuritava kemikaali määramisega spetsiifilise analüüsi abil. Tavaliselt ei jää adsorbeeritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamine suureks kogu katse vältel; üldiselt toimub alguses suures koguses kõrvaldamine, mis langeb järk-järgult tasakaaluväärtusele. Kui adsorbeeritav uuritav kemikaal suudab siiski mingil viisil põhjustada mikroobipopulatsiooni aklimatiseerumise, siis suureneb seejärel uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr ja jõuab kõrge platooväärtuseni.

▼ **M4***Ootefaas*

58. Nagu ka staatilistes sõelumiskatsetes, nii vajavad uuritavad kemikaalid enne täieliku biolagundamise toimumist sageli ootefaasi. Ootefaasis toimub lagundavate bakterite aklimatiseerumine või kohanemine ja uuritavat kemikaali peaaegu ei kõrvaldata; seejärel toimub kõnealuste bakterite esialgne kasv. See faas lõpeb ja lagundamisfaasi alguseks peetakse hetke, kui ligikaudu 10 % uuritava kemikaali esialgsest kogusest on kõrvaldatud (võttes arvesse adsorptsiooni, kui see toimub). Ootefaasi pikkus võib olla väga erinev ja halvasti reprodutseeritav.

Platoofaas

59. Pidevas katses kõrvaldamist näitava kõvera platoofaas on määratletud kui faas, milles lagundamine on maksimaalne. Platoofaas peaks kestma vähemalt kolm nädalat ja selle käigus tuleks mõõta ligikaudu 15 kehtivat näitajat.

Uuritava kemikaali keskmine kõrvaldamise määr

60. Arvutage uuritava kemikaali kõrvaldamise näitaja (D_t) väärtustest platoofaasis keskvääratus. See on uuritava kemikaali kõrvaldamise määr ümardatuna lähima täisarvuni (1 %). Samuti soovitatakse arvutada keskvääratuse 95 % usaldusvahemik.

Orgaanilise kasvukeskkonna kõrvaldamine

61. Koostage kontrollseadme orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamisprotsendi ajast sõltuvuse graafik (D_B). Märkige keskmine kõrvaldamise määr samal viisil kui uuritava kemikaali puhul (punkt 60).

Biolagundamise tunnused

62. Kui uuritav kemikaal ei adsorbeeru märkimisväärselt aktiivmudasse ja kõrvaldamist näitaval kõveral on ootefaasiga, lagundamis- ja platoofaasiga biolagundamist näitava kõvera tavapärane kuju (punktid 58, 59), siis võib kindel olla, et mõõdetud kõrvaldamine on põhjustanud biolagundamine. Kui on toimunud suures koguses esialgne kõrvaldamine, siis ei suuda simulatsioonikatse eristada bioloogilise ja abiootilise kõrvaldamise protsesse. Sellistel juhtudel ja muudel juhtudel, kui biolagundamise suhtes tekivad kahtlused (näiteks kui toimub väljapuhumine (*stripping*)), tuleb analüüsida adsorbeerunud uuritavaid kemikaale või teha täiendavad staatilised biolagundamise katsed täpselt bioloogilisi protsesse näitavate parameetrite alusel. Kõnealused katsed on hapniku sidumise meetodid (käesoleva lisa peatüki C.4 meetodid C.4-D, C.4-E ja C.4-F (6)) või katse, milles mõõdetakse süsinikdioksiidi tekkimist (käesoleva lisa peatüki C.4 meetod C.4-C (6)) või ISO *Headspace*-meetod (18), kasutades simulatsioonikatsest eelnevalt kokku puutunud inokulumi. Kui mõõdetud on nii lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist kui ka konkreetse kemikaali kõrvaldamist, siis näitab kõrvaldamisprotsentide oluline erinevus (kui esimene on viimati nimetatust väiksem) orgaaniliste vahesaaduste olemasolu väljavoolus; selliseid vahesaadusi võib olla keerulisem lagundada kui lähtekemikaali.

Katsetulemuste kehtivus

63. Inokulumi tavapärase biolagundamise käitumise kohta on saadud teavet, kui on määratud orgaanilise kasvukeskkonna kõrvaldamise määr (punkt 53) kontrollseadmes. Katset võib pidada kehtivaks, kui lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise määr kontrollseadme(te)s on kahe nädala möödudes > 80 % ja ei ole täheldatud ebatavalisi asjaolusid.

▼ M4

64. Kui on kasutatud kiirelt biolagundatavat (võrdlus)kemikaali, peaks biolagunemise määr (D_t , punkt 52) olema > 90 %.
65. Kui katse tehakse nitritseerivates tingimustes, peaks väljavoolude keskmine kontsentratsioon olema < 1 mg/l ammoniaaklämmastikku ja < 2 mg/l nitritlämmastikku.
66. Kui need kriteeriumid (punktid 63–65) ei ole täidetud, siis korrake katset muust allikast pärit inokulumiga, katsetage võrdluskemikaali ja vaadake läbi kõigi katsete tegemise käik.

Katseprotokoll

67. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

Uuritav kemikaal:

- tunnusandmed;
- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused.

Katsetingimused:

- katsesüsteemi tüüp, mis tahes muudatused lahustumatu või lenduva kemikaali katsetamiseks;
- orgaanilise kasvukeskkonna tüüp;
- tööstusliku reovee osakaal reovees ja selle laad, kui see on teada;
- inokulum, laad ja proovivõtukoht (-kohad), kontsentratsioon ja kõik eeltötlused;
- uuritava kemikaali põhilahus: lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus; suspensiooni korral selle valmistamise viis; kasutatud katsekonsentratsioon; kui see on väljaspool vahemikku 10–20 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku, siis selle põhjendus; lisamise meetod; esmakordse lisamise kuupäev; kõik muudatused;
- keskmine muda kasutamise aeg ja keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg; muda kõrvaldamise meetod; muda pundumise, kao jne vältimise meetodid;
- kasutatud analüüsimeetodid;
- katsetemperatuur;
- muda pundumisomadused, muda mahuindeks (*sludge volume index*, SVI), muda kontsentratsioon aktiivmudas (*mixed liquor suspended solids*, MLSS);
- kõik kõrvalekalded tavalisest katse käigust ja kõik asjaolud, mis võivad olla mõjutanud tulemusi.

Katsetulemused:

- kõik mõõdetud andmed (lahustunud orgaaniline süsinik, keemiline hapnikutarve, uuritava kemikaali määramine spetsiifilise analüüsimeetodiga, pH, temperatuur, hapniku kontsentratsioon, hõljuvaine, N-kemikaalid (kui see on asjakohane));
- kõik D_t (või D_{tC}), D_B , D_{St} arvutatud väärtused tabelite kujul ja kõrvaldamist näitavad kõverad;
- teave ootefaasi ja platoofaasi, katse kestuse, uuritava kemikaali ja kontrollseadme orgaanilise kasvukeskkonna kõrvaldamise määra kohta koos statistilise teabe ja kinnitustega biolagundatavuse ja katse kehtivuse kohta;
- tulemuste arutelu.

▼ **M4***KIRJANDUS*

- 1) Swisher RD (1987). „Surfactant Biodegradation”, 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.
- 2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698–706.
- 3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot method for assessing biodegradability. Technical Report No.70, Water Research Centre, Medmenham, UK.
- 4) Painter HA and King EF (1978b). The effect of phosphate and temperature on growth of activated sludge and on biodegradation of surfactants. Wat. Res. 12: 909–915.
- 5) Eckenfelder, W.W (19) US EPA.
- 6) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine”.
- 7) Käesoleva lisa peatükk C.12 „Biodegradatsioon – modifitseeritud SCAS test”.
- 8) Käesoleva lisa peatükk C.19 „Adsorptsiooniteguri (K_{OC}) kindlaksmääramine mullas ja reoveesettes kõrgsurvevedelikkromatograafia (HPLC) abil”.
- 9) Gerike P and Fischer WK (1979). A correlation study of biodegradability determinations with various chemicals in various tests. Ecotox. Env. Saf. 3:157–173.
- 10) Gerike P and Fischer WK (1981), as (9), II Additional results and conclusions. Ecotox. Env. Saf. 5: 45–55.
- 11) Painter HA and Bealing D (1989). Experience and data from the OECD activated sludge simulation test. pp 113–138, In: Laboratory tests for simulation of water treatment processes. CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- 12) ISO 11733 (1995; revised 2004). Evaluation of the elimination and biodegradability of organic substances in an aqueous medium - activated sludge simulation test.
- 13) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornada Com. Espanol. Deterg.: 33–48.
- 14) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S. 61 (2): 340–343.
- 15) Gerike P, Fischer WK and Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD confirmatory test. Wat.Res. 14: 753–758.
- 16) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox. 10: 214–220.
- 17) Her Majesty’s Stationery Office (1982). Assessment of biodegradability. Methods for the examination of waters and associated materials. pp. 91–98, ISBN 011 751661 9.
- 18) ISO 14593 (1998). Water Quality - Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic compounds. Method by the analysis of inorganic carbon in sealed vessels.

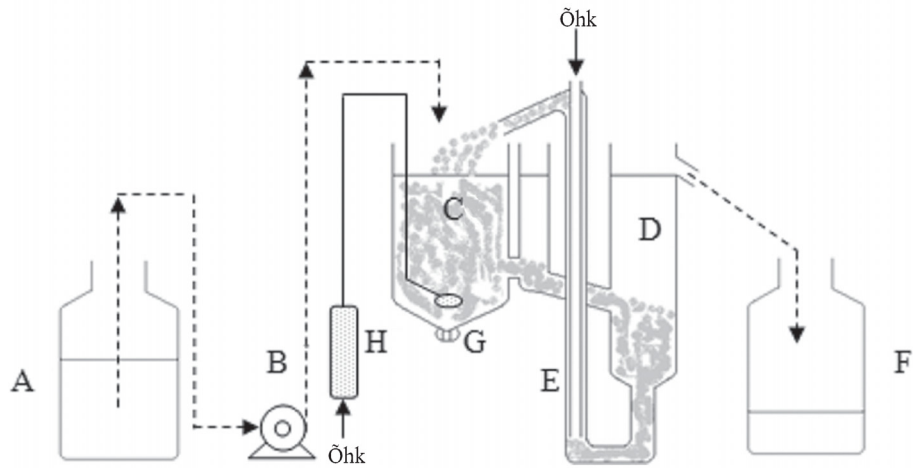
▼M4

1. liide

Joonis 1

Seade biolagundatavuse hindamiseks

Husmanni seade

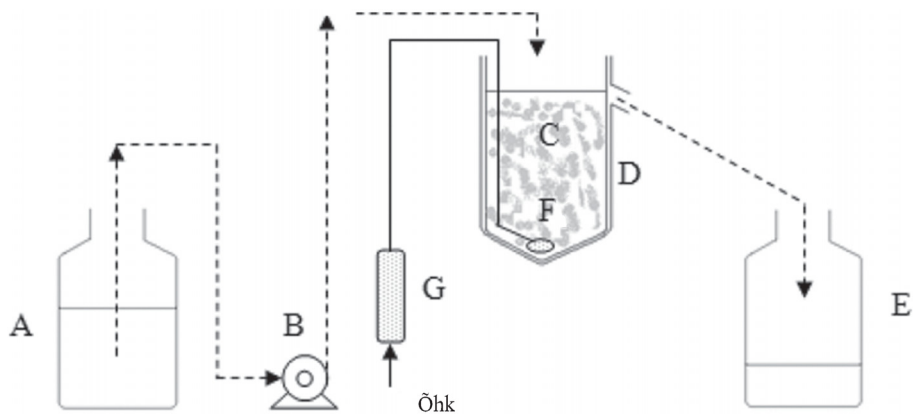


- | | |
|---------------------------------|-------------------|
| A. Hoiunõu | E. Suruõhupump |
| B. Doseerimispuump | F. Kogumisnõu |
| C. Aeratsioonikamber (maht 3 l) | G. Aeraator |
| D. Settimisnõu | H. Õhuvoolumõõtur |

Joonis 2

Seade biolagundatavuse hindamiseks

Poorne pott

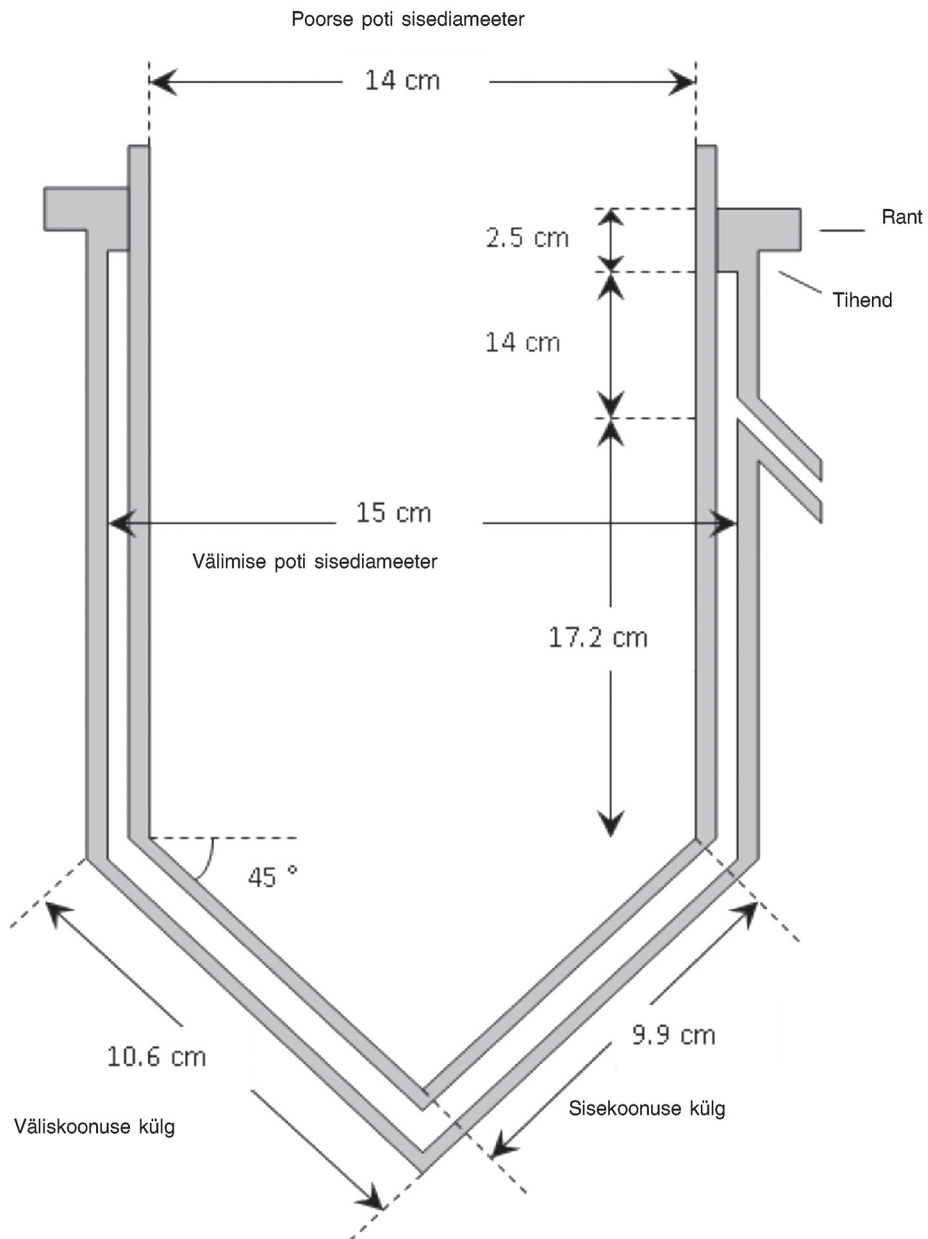


- | | |
|---------------------------------|-------------------|
| A. Hoiunõu | E. Kogumisnõu |
| B. Doseerimispuump | F. Difusiooninõu |
| C. Poorne aeratsiooninõu | G. Õhuvoolumõõtur |
| D. Mitteläbilaskev välimine nõu | |

▼ M4

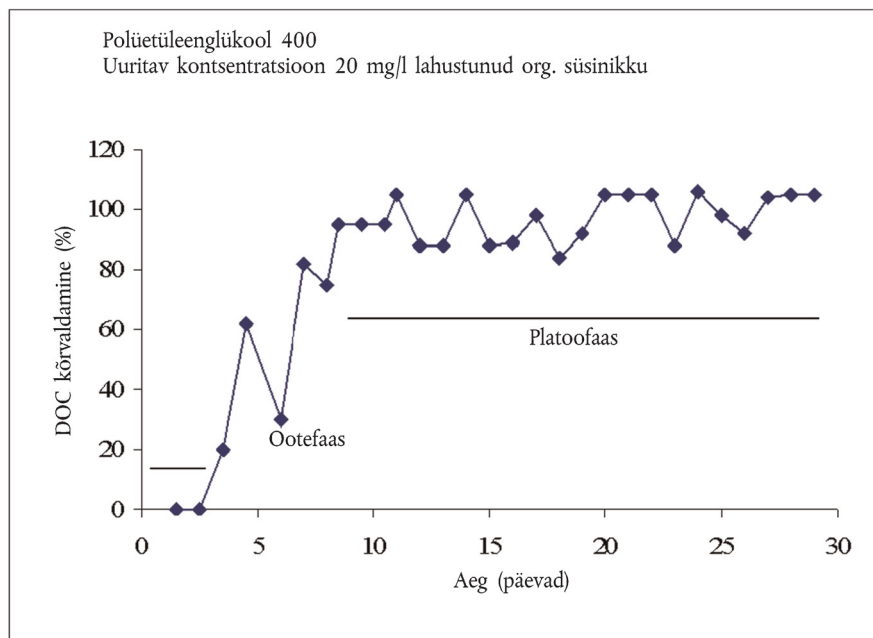
Joonis 3

Kolmeliitrisse poorse poti aeratsiooninõu andmed



▼ **M4**

2. liide

Kõrvaldamiskõvera näide

▼ **M4**

3. liide

[TEADMISEKS]

KATSESEADMETE ÜHENDAMINE

Et proovida võrdsustada reovett ja katsekemikaali käitleva katseseadme ning ainult reovett käitleva kontrollseadme mudade mikroobipopulatsioone, võeti kasutusele mudade igapäevane vahetamine teineteisega (1). See tegevus nimetati ühendamiseks ja selle meetodi kohta kasutatakse nimetust ühendatud seadmed. Ühendamist kasutati esialgu Husmanni aktiivmuda seadmetes, kuid seda on tehtud ka poorse poti seadmetega (2, 3). Ühendamata ja ühendatud seadmete vahel ei leitud Husmanni seadmete ega ka poorse poti seadmete kasutamisel tulemustes märkimisväärseid erinevusi, seega ei anna seadmete ühendamiseks kulutatud aeg ja energia eeliseid.

Mudavahetused võivad jätta olulise kõrvaldamise mulje, kuna osa katsekemikaalist kantakse üle ning katsekemikaali kontsentratsioonid katse- ja kontrollseadmete väljavooludes muutuvad peaaegu võrdseks. Seega tuleb kasutada parandustegureid, mis olenevad vahetatud osa suurusest ja keskmisest hüdraulilisest retentsiooniajast. Arvutuste täpsemad kirjeldused on avaldatud (1).

Lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise määra parandatud väärtused saab arvutada järgmise üldvalemi alusel:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12)/(1 - a \cdot r/12)\%$$

kus

D_{tc} = lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise parandatud protsent

D_t = lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe kõrvaldamise määratud protsent

a = aktiivmuda seadmete mahust vahetatud osa

r = keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg (h)

Kui vahetatakse näiteks pool aeratsiooninõu mahust ($a = 0,5$) ja keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg on kuus tundi, on parandusteguri võrrand järgmine:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

KIRJANDUS

- 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 HA, Bealing DJ (1989). Experience and Data from the OECD Activated Sludge Simulation Test. pp. 113–138. In: Laboratory Tests for Simulation of Water Treatment Processes CEC Water Pollution Report 18. Eds. Jacobsen BN, Muntau H, Angeletti G.
- 3) Painter HA, King EF (1978). Water Research Centre Porous Pot Method for Assessing Biodegradability. Technical Report TR70, Water Research Centre, Stevenage, UK.

▼ **M4**

4. liide

AKTIIVMUDA INHIBITSIOONI HINDAMINE

Protsessi inhibeerimine uuritava kemikaali poolt

1. Kemikaali (või reovett) ei pruugita simulatsioonikatses käigus lagundada või kõrvaldada ning see võib isegi inhibeerida muda mikroorganisme. Muid kemikaale biolagundatakse väikesel kontsentratsioonil, kuid neil on suuremal kontsentratsioonil inhibeeriv mõju (hormees). Inhibeeriv mõju võib olla leitud juba varasemal etapil või selle võib kindlaks teha mürgisuse katsega, kasutades simulatsioonikatses kasutatavaga samalaadset või identset inokulumi (1). Kõnealused meetodid on hapniku tarbimise inhibitsioon (käesoleva lisa peatükk C.11 (2) ja ISO 8192 (3)) või muda organismide kasvu inhibitsioon (ISO 15522 (4)).
2. Simulatsioonikatses ilmneb inhibitsioon katsenõust ja kontrollnõust saadud väljavoolus lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe erinevusena, mis on suurem kui uuritava kemikaalina lisatud lahustunud orgaaniline süsinik. Teisisõnu öelduna väheneb töötlemise käigus orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilise süsiniku (ja biokeemilise hapnikutarbe, keemilise hapnikutarbe ja/või NH_4^+) kõrvaldamise protsent uuritava kemikaali olemasolu tõttu. Sellisel juhul tuleks katset korrata, vähendades uuritava kemikaali kontsentratsiooni, kuni jõutakse tasemeni, mille juures inhibitsiooni ei teki, ja kui võib-olla vähendada kontsentratsiooni veel, hakatakse uuritavat kemikaali biolagundama. Kui uuritaval kemikaalil (või reoveel) on siiski protsessile kõigil katsetatud kontsentratsioonidel kahjulik mõju, näitab see seda, et kõnealust kemikaali on keeruline kui mitte võimatu bioloogiliselt töödelda, kuid otstarbekas võib olla korrata katset muust allikast pärit aktiivmudaga ja/või lastes mudal järkjärgulisemalt aklimatiseeruda.
3. Vastupidisel juhul, kui uuritav kemikaal simulatsioonikatses esimesel katsel biokõrvaldatakse, tuleks selle kontsentratsiooni suurendada, kui on vaja teada, kas kemikaalil võiks olla inhibeeriv mõju.
4. Inhibitsiooni astmete määramisel tuleks meeles pidada, et aktiivmuda populatsioon võib muutuda ja seega võivad mikroorganismid aja jooksul hakata inhibeerivat kemikaali taluma.
5. Inhibitsiooni määra arvutamine:

katse- ja kontrollseadmete biokeemilise hapnikutarbe, lahustunud orgaanilise süsiniku, keemilise hapnikutarbe jne üldist kõrvaldamise protsenti R_o saab arvutada järgmise võrrandi alusel:

$$R_o = 100 (I - E)/I \%$$

kus:

I = katse- ja kontrollnõu biokeemilise hapnikutarbe, lahustunud orgaanilise süsiniku, keemilise hapnikutarbe jne kontsentratsioon (mg/l) sissevoolus,

E = vastavad kontsentratsioonid (mg/l) väljavoolus.

I ja E tuleb katseseadmetes uuritava kemikaalina lisatud lahustunud orgaanilise süsiniku arvestamiseks parandada, muidu annavad inhibitsiooniprotsendi arvutused vale tulemuse.

▼M4

Uuritavast kemikaalist tingitud inhibitsiooni määra saab arvutada järgmise võrrandi alusel:

$$\% \text{ inhibitsiooniprotsent} = 100 (R_c - R_t) / R_c$$

kus:

R_c = kontrollnõudes kõrvaldamise protsent

R_t = katsenõudes kõrvaldamise protsent

KIRJANDUS

- 1) Reynolds L *et al.* (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. *Chemosphere* 16: 2259.
- 2) Käesoleva lisa peatükk C.11 „Biodegradatsioon – aktiivmuda respiratsiooni pärssimise katse”.
- 3) ISO 8192 (2007) Water quality - Test for inhibition of oxygen consumption by activated sludge for carbonaceous and ammonium oxidation.
- 4) ISO 15522 (1999) Water Quality - Determination of the inhibitory effect of water constituents on activated sludge microorganisms.

▼ **M4**

5. liide

Vees halvasti lahustuvad uuritavad kemikaalid – lenduvad kemikaalid**Vees halvasti lahustuvad kemikaalid**

Vees halvasti lahustuvate ja mittelahustuvate kemikaalide kasutamise kohta reovee puhastamist simuleerivates katsetes näib olevat avaldatud vähe töid (1, 2, 3).

Ei ole ühtegi uuritava kemikaali hajutamise meetodit, mis oleks kohaldatav kõigile mittelahustuvatele kemikaalidele. Näib, et kaks neljast standardis ISO 10634 (4) kirjeldatud meetodist on sobivad simulatsioonikatsetes uuritavate kemikaalide hajutamise proovimiseks; need on emulgaatorite ja/või ultrahelienergia kasutamine. Tuleks määrata niiviisi saadava dispersiooni püsivus vähemalt 24 tunni jooksul. Asjakohaselt stabiliseeritud dispersioone, mida hoitakse pidevalt segatavas mahutis (punkt 38), tuleks seejärel doseerida aeratsiooninõusse eraldi olmeveest (või sünteetilisest reoveest).

Kui dispersioon on stabiilne, siis tuleb uurida, kuidas uuritavat kemikaali saab hajutatud kujul määrata. Lahustunud orgaaniline süsinik tõenäoliselt selleks ei sobi, seega tuleks uuritava kemikaali jaoks leida spetsiifiline analüüsimeetod, mida võiks kasutada väljavoolude, väljavoolu tahkete osakeste ja aktiivmuda puhul. Aktiivmuda protsessi simuleerimisel uuritava kemikaaliga toimuvad reaktsioonid tuleks seejärel määrata vedel- ja tahkes faasis. Seega määratakse massibilanss, et otsustada, kas uuritav kemikaal on biolagundatud. See näitaks siiski ainult esmast biolagunemist. Täieliku biolagunemise tõendamist tuleks proovida, kohaldades kiirele biolagundatavusele respirometrilist katset (käesoleva lisa peatüki C.4 (5) meetodid C.4-C, C.4-F või C.4-D), kasutades inokulumina simulatsioonikatses uuritava kemikaaliga kokku puutunud muda.

Lenduvad kemikaalid

Reovee puhastamise simulatsioonide kohaldamine lenduvatele kemikaalide on nii vaieldav kui ka problemaatiline. Nagu ka vees halvasti lahustuvate uuritavate kemikaalide puhul, näib olevat avaldatud vähe artikleid, milles kirjeldatakse lenduvate kemikaalide simulatsioonikatseid. Kasutatakse tavalist tüüpi täieliku segamise seadet ja tihendatud aeratsiooni- ja settenõusid, mõõdetakse ja kontrollitakse voolumõõdikute abil õhuvoolu ning juhitakse väljuv gaas läbi separaatorite, et koguda lenduvat orgaanilist ainet. Mõnikord kasutatakse vaakumpumpa, et juhtida väljuv gaas läbi külmseparaatori või läbipuhumis-separaatori, mis sisaldab gaaskromatograafiliste analüüsise jaoks Tenaxit ja silikageeli. Separaatoris leiduva uuritava kemikaali saab määrata analüütiliselt.

Katse tehakse kahes osas. Seadmeid käitatakse kõigepealt ilma mudata, aga sünteetilise reoveega ja uuritava kemikaaliga, mida pumbatakse aeratsiooninõusse. Kogutakse sissevoolu, väljavoolu ja väljutatud gaasi proovid ning paari päeva jooksul analüüsitakse uuritava kemikaali olemasolu neis. Kogutud andmete alusel on võimalik arvutada süsteemist väljapuhutud uuritava kemikaali protsent (R_{vs}).

Seejärel tehakse (mudaga) tavaline bioloogiline katse väljapuhumise uuringuga identsetes tingimustes. Samuti tehakse lahustunud orgaanilise süsiniku või keemilise hapnikutarbe mõõtmised, et kontrollida seadmete tõhusat toimimist. Katse esimese osa jooksul tehakse aeg-ajalt analüüse, et määrata uuritav kemikaal sissevoolus, väljavoolus ja väljuvas gaasis; pärast aklimatiseerumist tehakse analüüse sagedamini. Statsionaarse oleku andmete põhjal võib arvutada uuritava kemikaali kõigi protsesside (füüsikaline ja bioloogiline) käigus vedelfaasist kõrvaldamise protsendi (R_T) ning samuti süsteemist väljapuhutud osa (R_V).

▼ **M4**

Arvutus

- a) Mittebioloogilises katses võib arvutada süsteemist väljapuhutud uuritava materjali protsenti (R_{VP}) järgmise võrrandi alusel:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

kus

R_{VP} = uuritava kemikaali kõrvaldamine lendumise teel (%);

S_{VP} = separaatorisse kogutud uuritav kemikaal, väljendatuna vedelfaasi võrdväärse kontsentratsioonina (mg/l);

S_{IP} = uuritava kemikaali kontsentratsioon sissevoolus (mg/l).

- b) Bioloogilises katses võib arvutada süsteemist väljapuhutud uuritava materjali protsenti (R_V) järgmise võrrandi alusel:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

kus

R_V = uuritava kemikaali kõrvaldamine lendumise teel bioloogilises katses (%);

S_V = separaatorisse kogutud uuritav kemikaal bioloogilises katses, väljendatuna sissevooluvedeliku võrdväärse kontsentratsioonina (mg/l);

S_I = uuritava kemikaali kontsentratsioon sissevoolus (mg/l).

- c) Bioloogilises katses võib kõikides protsessides kõrvaldatud uuritava kemikaali protsenti (R_T) leida järgmise võrrandi alusel:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

kus

S_E = uuritava kemikaali kontsentratsioon (vedelas) väljavoolus (mg/l).

- d) Seega on võimalik arvutada biolagundamise ja adsorptsiooni teel kõrvaldatud protsenti (R_{BA}) järgmisest võrrandist:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Tuleks teha eraldi katsed, et teha kindlaks, kas uuritavat kemikaali adsorbeeritakse; kui see on nii, siis võib teha täiendava paranduse.

- e) Bioloogilisest (R_V) ja mittebioloogilisest (R_{VP}) katsesüsteemist väljapuhutud uuritava kemikaali osakaalu võrdlemine näitab üldist mõju, mis bioloogilisel töötlemisel on uuritava kemikaali heitele atmosfääri.

Näide: benseen

Muda retentsiooniaeg = neli päeva

Sünteesilise reovee retentsiooniaeg = kaheksa tundi

$S_{IP} = S_I = 150$ mg/l

$S_{VP} = 150$ mg/l ($S_{EP} = 0$)

$S_V = 22,5$ mg/l

$S_E = 50$ µg/l

▼M4

Seetõttu

$R_{VP} = 100 \%$, $R_V = 15 \%$

$R_T = 100 \%$ ja $R_{BA} = 85 \%$.

Eeldati, et benseen ei adsorbeerunud mudale.

KIRJANDUS

- 1) Horn JA, Moyer JE, Hale JH (1970). Biological degradation of tertiary butyl alcohol. Proc. 25th Ind. Wastes Conference Purdue Univ.: 939–854.
- 2) Pitter P, Chudoba J (1990). Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press. Boston, USA.
- 3) Stover EL, Kincannon DF (1983). Biological treatability of specific organic compounds found in chemical industry waste waters. J. Wat. Pollut. Control Fed. 55: 97.
- 4) ISO 10634 (1995) 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.
- 5) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine”.

▼ **M4**

6. liide

Muda retentsioonija mõju kemikaalide töödeldavusele

SISSEJUHATUS

1. Peamises tekstiosas kirjeldatud meetod kavandati selleks, et teha kindlaks, kas uuritavaid kemikaale (üldjuhul neid, mis on teadaolevalt iseeneslikult, aga mitte kohe biolagundatavad) on võimalik biolagundada reoveepuhastite piiratud tingimustes. Tulemused väljendatakse kõrvaldamise protsendina ja biolagundamise protsendina. Aktiivmuda seadmete käitamise tingimused ja sissevoolu valik võimaldavad uuritava kemikaali kontsentratsiooni puhul väljavoolus üpris suuri erinevusi. Katsed tehakse ainult ühel muda tahkete osakeste nominaalsel kontsentratsioonil või ühe nominaalse muda retentsioonijaga ning kirjeldatud muda kõrvaldamise režiimid võivad põhjustada muda retentsioonija väärtuse märkimisväärset erinemist katse vältel nii eri päevadel kui ka ühe päeva jooksul.
2. Selle variandi (1, 2) puhul kontrollitakse muda retentsiooniga palju kitsamates piirides iga 24-tunnise ajavahemiku vältel (täpselt nagu suure ulatuse puhul), mille tulemusel saadakse püsivam kontsentratsioon väljavooludes. Soovitatakse kasutada olmereovett, kuna see annab kõrvaldamise püsivama ja suurema osakaalu. Samuti uuritakse mitme muda retentsioonija väärtuse mõju ning üksikasjalikumas uuringus võidakse määrata väljavoolu kontsentratsiooni sõltuvus temperatuurist.
3. Seni ei ole ühist arusaama selle kohta, millised kineetilised mudelid kirjeldavad kemikaali lagunemist reovee puhastamisel teatavatel tingimustel. Kogutud andmete kirjeldamiseks valiti bakterite kasvu ja substraadi kasutamise Monod' mudel (1, 2), kuna meetodit oli kavas kasutada ainult suurtes kogustes toodetavate kemikaalide puhul, mille kontsentratsioon reovees on üle 1 mg/l. Lihtsustatud mudeli ja tehtud eelduste õigsust kontrolliti erineva esmase biolagundatavusega alkoholetoksülaatide seeria abil (2, 3).

Märkus. Selles meetodi variandis on lähedastel järgitud suurt osa käesoleva katsemeetodi C.10-A tekstist ning allpool on esitatud ainult need üksikasjad, mis on erinevad.

KATSE PÕHIMÕTE

4. Aktiivmuda poorse poti seadmeid, mis on projekteeritud selleks, et võimaldada (peaaegu) pidevat vedela segu kõrvaldamist ja muda retentsioonija (SRT või θ_s) väga täpset reguleerimist, kasutatakse ühendamata režiimis mitme muda retentsioonijaga ning soovi korral mitmel temperatuuril. Retentsiooniaeg on tavaliselt vahemikus 2–10 päeva ja temperatuur on 5–20 °C. Reovett (eelstatavalt olmereovett) ja uuritava kemikaali lahust doseeritakse seadmetesse eraldi sellise kiirusega, et saavutada nõutav reovee retentsiooniaeg (3–6 tundi) ja uuritava kemikaali nõutav kontsentratsioon sissevoolus. Kontrollseadmeid, kuhu uuritavat kemikaali ei lisata, käitatakse samal ajal võrdlusandmete saamiseks.
5. Võib kasutada muud tüüpi seadmeid, kuid tuleks olla väga hoolikas, et tagada muda retentsioonija hea reguleerimine. Näiteks settenõuga puhasti kasutamisel võib olla vaja võtta arvesse puhasti väljavoolu kaudu toimuvat tahkete osakeste kadu. Lisaks tuleks võtta erilisi ettevaatusabinõusid, et vältida vigu, mida põhjustab muda koguse varieerumine settenõus.

▼M4

6. Seadmeid käitatakse iga valitud tingimuste komplektiga ja pärast tasakaaluoleku saavutamist määratakse uuritava kemikaali väljavoolude keskmised statsionaarse oleku kontsentratsioonid ning soovi korral lahustunud orgaanilise süsiniku näitajad ligikaudu kolmenädalase ajavahemiku vältel. Lisaks uuritava kemikaali ja, soovi korral, lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise protsendi hindamisele tuleb graafiliselt esitada väljavoolu kontsentratsiooni sõltuvus puhasti kasutustingimustest. Selle alusel saab arvutada esialgsed kineetilised konstandid ja ennustada tingimusi, milles võib töödelda uuritavat kemikaali.

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

7. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 12 ja 13.

KÜNNISVÄÄRTUSED

8. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 14 ja 15.

VÕRDLUSALUSENA KASUTATAV UURITAV KEMIKAAL

9. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 16.

KATSETULEMUSTE REPRODUTSEERITAVUS

10. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 17 ja 18.

MEETODI KIRJELDUS**Seadmed**

11. Sobiv seade on muudetud poorse poti süsteem (liide 6.1). See koosneb sisemisest nõust (või vooderdisest), mis on valmistatud poorsest polüpropüleenist; vooderdise paksus on 3,2 mm ja poori suurus ligikaudu 90 µm. Nende omavaheline ühendus põkk-keevitatakse. (Nii saadakse töökindlam seade kui käesoleva peatüki C.10-A punktis 21 kirjeldatud seade). Vooderdis on paigutatud vett mitte läbi laskvasse polüetüleenist välisnõusse, mis koosneb kahest osast: ringikujuline alus, millesse on puuritud augud, et paigaldada kaks õhuvoolikut ja muda kõrvaldamise voolik, ning ülemine silinder, mis kruvitakse põhja külge ja millele on paigaldatud väljund, et tagada poorse poti teadaolev maht (3 liitrit). Üks õhuvoolikutest on varustatud õhuvoolu hajutava otsikuga (difuusorkiviga); teine on avatud otsaga ja asetatud potis kivi suhtes täisnurga all. Kõnealune süsteem tekitab keerise, mis on vajalik selleks, et poti sisu oleks täielikult segatud, ning tagab samuti lahustunud hapniku kontsentratsiooni üle 2 mg/l.
12. Vajalik arv seadmeid hoitakse reguleeritud temperatuuril vahemikus 5–20 °C (±1 °C) kas veevannis või püsiva temperatuuriga ruumis. Pumbad on vajalikud, et doseerida aeratsiooninõudesse uuritava kemikaali lahust ja settinud reovett nõutava kiirusega (vastavalt 0–1,0 ml/min ja 0–25 ml/min) ning kolmas pump on vajalik selleks, et kõrvaldada reomuda aeratsiooninõudest. Vajalik väga väike reomuda voolukiirus saavutatakse pumbaga, mis on seatud suuremale kiirusele ja mis lülitatakse aeg-ajalt sisse taimeriga lüliti abil, näiteks lülitatakse sisse 10 sekundiks minutis, pumpamiskiirus on 3 ml/min, mis annab kõrvaldamise kiiruse 0,5 ml/min.

Filtrimiseseade või tsentrifuug

13. Kohaldatakse peatüki C10-A punkti 23.

Analüüiseseadmed

14. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 24.

Vesi

▼M4

15. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 25 ja 26.

Orgaaniline kasvukeskkond

16. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 27.

Sünteesiline reovesi

17. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 28.

Olmereovesi

18. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 29.

Aktiivmuda

19. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkti 30.

Uuritava kemikaali põhilahus

20. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 31 ja 32.

KATSE KÄIK*Inokulumi valmistamine*

21. Kohaldatakse ainult peatüki C.10-A punkti 34; kasutage aktiivmuda (ligikaudu 2,5 g/l).

Katseseadmete arv

22. Lihtsa katse jaoks, s.o kõrvaldamise protsendi mõõtmiseks, on vajalik ainult üks muda retentsiooniaeg, kuid ligikaudsete kineetiliste konstantide arvutamiseks vajalike andmete saamiseks on vaja 4 või 5 muda retentsiooniaja väärtust. Tavaliselt valitakse väärtused vahemikus 2–10 päeva. Praktistel kaalutlustel on kasulik teha katse samal ajal 4 või 5 muda retentsiooniajaga ühel temperatuuril; pikendatud uuringute puhul kasutatakse muudel temperatuuridel vahemikus 5–20 °C samu muda retentsiooniaja väärtusi või erinevat väärtuste vahemikku. Esmase biolagunemise (peamine kasutus) korral on ühe tingimuste komplekti jaoks vaja tavaliselt ainult ühte seadet. Täieliku biolagunemise korral on siiski iga tingimuste komplekti jaoks vaja kontrollseadet, millesse lisatakse reovett, kuid mitte uuritavat kemikaali. Kui arvatakse, et uuritavat kemikaali esineb kasutatavas reovees, oleks vaja kasutada esmase biolagunemise hindamisel kontrollseadmeid ja teha arvutustes vajalikud parandused.

Orgaanilise kasvukeskkonna ja uuritava kemikaali doseerimine

23. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 36–39, kuid pange tähele, et uuritava kemikaali lahust doseeritakse eraldi ja kasutatakse erinevaid muda kõrvaldamise määrasid. Samuti tuleb sagedasti jälgida (näiteks kaks korda päevas) sissevoolu, väljavoolu ja muda kõrvaldamise voolukiiruseid ning vajaduse korral neid kohandada, et erinevus soovitud oleks ± 10 % piires. Kui olmevee kasutamisel tekivad analüüsimeetoditega seotud probleemid, siis tehke katse sünteetilise reoveega, aga tuleb tagada, et erinevad kasvukeskkonnad annavad võrreldavaid kineetilisi andmeid.

Aktiivmuda seadmete käsitsemine

24. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 40–43, kuid reguleerige muda retentsiooniaega ainult muda „pideva” kõrvaldamise abil.

Proovide võtmine ja analüüsimine

25. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 44–50, selle erinevusega, et tuleb määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon ja soovi korral lahustunud orgaaniline süsinik; keemilist hapnikutarvet ei tohiks kasutada.

▼ **M4****ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste töötlemine**

26. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 52–54.

Katsetulemuste esitamine

27. Kohaldatakse peatüki C.10-A punkte 56–62.

Kineetiliste konstantide arvutamine

28. Esmase biolagundamise protsendi esitamise asemel on realistlikum esitada uuritava kemikaali keskmine statsionaarse oleku kontsentratsioon väljavoolus ja kirjeldada, kuidas see sõltub puhasti erinevatest käitamise tingimustest. Seda on võimalik teha liites 6.2 esitatud võrrandi 6 abil, millest võib leida K_S , μ_m ja θ_{SC} väärtused (muda kriitiline retentsiooniaeg).

(Selle asemel võib leida K_S ja μ_m ligikaudsed väärtused, kasutades lihtsat arvutiprogrammi, millega võrrandi 2 (liide 6.2) järgi arvutatud teoreetilist kõverat sobitatakse saadud eksperimentaalsete väärtustega. Kuigi ühtki lahendust ei saa pidada ainsaks õigeks lahenduseks, on võimalik saada K_S ja μ_m mõistlikud ligikaudsed väärtused.)

Tulemuste hajuvus

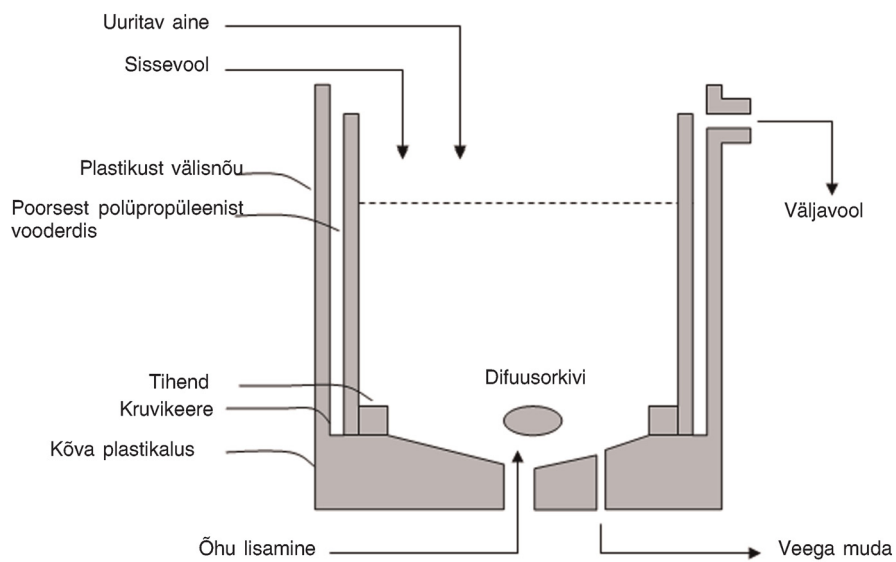
29. On teada, et iga üksiku kemikaali jaoks saadud kineetiliste parameetrite väärtused hajuvad. Arvatakse, et muda kasvatamise tingimused ning samuti katses valdavalt esinenud tingimused (nagu punktis 5 ja muudes katsetes) mõjutavad saadud väärtusi oluliselt. Ühte sellise muutlikkuse taku on arutanud Grady *et al.* (4), kes on soovitanud kasutada kineetilise eksperimendi käigus kultuuri saavutatava võimaliku füsioloogilise oleku kahe äärmusliku seisundi jaoks mõisteid „tegelikult esinev” (*extant*) ja „olemuslik” (*intrinsic*). Kui oleku muutumist katse jooksul ei lubata, väljendavad kineetilise parameetri väärtused selle keskkonna tingimusi, kust mikroorganismid hangiti; neid väärtusi nimetatakse tegelikult või parajasti esinevaks. Teise äärmuse korral, kui katsetingimused võimaldavad valgusünteesisüsteemi täielikku väljaarenemist ja seega maksimaalset võimalikku kasvukiirust, nimetatakse saadud kineetilisi parameetreid olemuslikuks ning need olenevad ainult substraadi laadist ja kultuuris sisalduvate bakterite tüüpidest. Juhinduda võib sellest, et tegelikult esinevad väärtused saadakse siis, kui substraadi kontsentratsiooni ja kompetentsete mikroorganismide suhe (S_0 / X_0) hoitakse madal, näiteks 0,025, ning olemuslikud näitajad esinevad siis, kui suhe on kõrge, näiteks vähemalt 20. Mõlemal juhul peaks S_0 olema asjakohase poolküllastatuse konstandiga K_S võrdne või seda ületama.
30. Tulemuste hajuvust ja muid biolagundamise kineetika tahke arutati hiljutises keskkonnatoksikoloogias ja -keemia ühingu õpikojas (5). Neist avaldatud ja kavandavatest uuringutest peaks saama selgema arusaama reoveepuhastites toimivast kineetikast, mis lubab olemasolevaid andmeid paremini tõlgendada ning tulevase katsemeetodeid paremini kavandada.

KIRJANDUS

- 1) Birch RR (1982). The biodegradability of alcohol ethoxylates. XIII Jornado Com. Espanol Deterg.: 33–48.
- 2) Birch RR (1984). Biodegradation of nonionic surfactants. J.A.O.C.S., 61(2): 340–343.
- 3) Birch RR (1991). Prediction of the fate of detergent chemicals during sewage treatment. J. Chem. Tech. Biotechnol., 50: 411–422.

▼ **M4**

- 4) Grady CPL, Smets BF and Barbeau DS (1996). Variability in kinetic parameter estimates: A review of possible causes and a proposed terminology. *Wat. Res.*, 30 (3): 742–748.
- 5) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales SG, Feitjel T, King H, Fox K, Verstraete W. 4-6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼ **M4***Liide 6.1***Muda retentsioonija reguleerimisega poorne pott**

▼ **M4**

Liide 6.2

Kineetiliste konstantide arvutamine

1. Kui eeldada Monod' kineetika kehtivust ning võtta arvesse aktiivsete tahkete osakeste ja substraadi massibilanssi aktiivmuda süsteemis (1), on võimalik leida järgmised statsionaarse oleku näitajad:

$$\frac{1}{\theta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

või

$$S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \theta_s)}{\theta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2],$$

kus

S_1 = substraadi kontsentratsioon väljavoolus (mg/l)

K_s = poolküllastatuse konstant, kontsentratsioon, mille juures $\mu = \mu_m/2$ (mg/l)

μ = kasvu erikiirus (d^{-1})

μ_m = μ_m (d^{-1}) maksimumväärtus

K_d = aktiivsete tahkete osakeste kadumise erikiirus (d^{-1})

θ_s = muda keskmine retentsiooniaeg, SRT (d)

Selle võrrandi uurimisel võib teha järgmised järeldused:

- i) väljavoolu kontsentratsioon ei sõltu sissevoolu kontsentratsioonist (S_0); seega muutub biolagundamise protsent sissevoolu kontsentratsiooni S_0 muutumisel;
- ii) ainus juhitav puhasti parameeter, mis mõjutab S_1 väärtust, on muda retentsiooniaeg θ_s ;
- iii) sissevoolu kindla kontsentratsiooni S_0 puhul on olemas kriitiline muda retentsiooniaeg, mis vastab järgmistele tingimustele:

$$\frac{1}{\theta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3],$$

kus

θ_{SC} = kriitiline muda retentsiooniaeg, millest väiksema väärtuse puhul uhutakse kompetentsed mikroorganismid puhastist välja;

- iv) kuna võrrandi 2 muud parameetrid on seotud kasvu kineetikaga, mõjutab temperatuur tõenäoliselt substraadi sisaldust väljavoolus ja muda kriitilist vanust, s.o teatava töötlemismäära saavutamiseks vajalik muda retentsiooniaeg suureneb temperatuuri vähendamisega.
2. Poorse poti süsteemi tahkete ainete massibilansi alusel ja eeldades, et tahkete osakeste kontsentratsioon puhasti väljavoolus X_2 on väike aeratsiooninõu kontsentratsiooniga X_1 võrreldes, on muda retentsiooniaeg

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

▼ M4

ja,

$$\theta_s = \frac{V \cdot X_1}{Q_1 \cdot X_1} = \frac{V}{Q_1}$$

kus

V = aeratsiooninõu maht (l)

X_1 = tahkete osakeste kontsentratsioon aeratsiooninõus (mg/l)

X_2 = tahkete osakeste kontsentratsioon väljavoolus (mg/l)

Q_0 = sissevoolu voolukiirus (l/d)

Q_1 = reomuda voolukiirus (l/d)

Seega on muda retentsiooniaega võimalik reguleerida mis tahes eelnevalt valitud väärtusele reomuda voolukiiruse Q_1 reguleerimisega.

Järeldused

3. Katse peamine eesmärk on seega võimaldada prognoosida kontsentratsiooni väljavoolus ja sellest tulenevalt uuritava kemikaali taset suublates.
4. Kui koostada väljavoolukontsentratsiooni S_1 retentsioonijast θ_s sõltuvuse graafik, on mõnikord võimalik hinnata muda kriitilist retentsiooniaega θ_{SC} , vt kõver 3 joonisel 1. Kui see ei ole võimalik, võib arvutada θ_{SC} koos μ_m ja K_S ligikaudsete väärtustega, kui koostada S_1 sõltuvus $S_1 \cdot \theta_s$ -st.

Võrrandi 1 teisendamise saame:

$$\frac{S_1 \cdot \theta_s}{1 + \theta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

Kui K_d on väike, siis $1 + \theta_s \cdot K_d \sim 1$ ja võrrandist 5 saame:

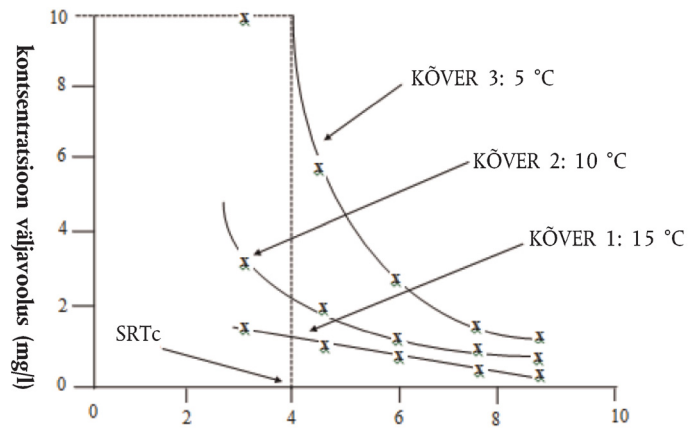
$$S_1 \cdot \theta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

Seega peaks graafik olema sirge joon (vt joonis 2) tõusuga $1/\mu_m$ ja algõiguga K_S/μ_m ; sellest tuleneb ka, et $\theta_S \sim 1/\mu_m$.

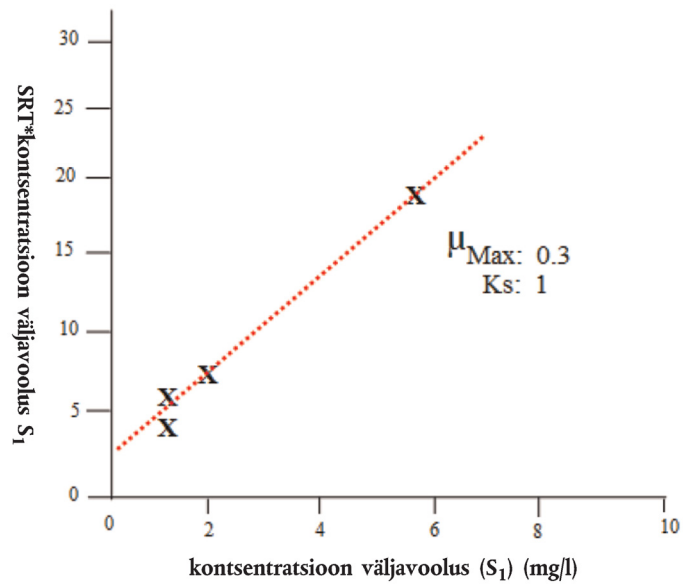
▼ **M4**

Joonis 1

Kolm temperatuuri; viis muda retentsiooniaega



Joonis 2

Muda retentsiooniaja regressioonijoon S_1 vs. S_1 T = 5 °C juures

Terminid:

kontsentratsioon väljavoolus

kõver

▼M4

7. liide

KATSE VÄIKESE KONTSENTRATSIOONI ($\mu\text{g/l}$) VAHEMIKUS

1. Paljud kemikaalid esinevad veekeskkonnas (isegi reovees) tavaliselt väga väheses kontsentratsioonis ($\mu\text{g/l}$). Sellises kontsentratsioonis ei ole need tõenäoliselt peamised kasvu põhjustavad substraadid; on tõenäoline, et neid lagundatakse kasvu mittepõhjustavate teiseste substraatidena koos mitmesuguste looduslike orgaaniliste ainetega. Seega ei vasta selliste kemikaalide lagunemine 6. liites esitatud mudelile. Võib kasutada mitmeid mudeleid ja reoveepuhastites peamiselt esinevates tingimustes võib samal ajal olla kasutatav rohkem kui üks mudel. Selle asjaolu täpsustamiseks tuleb teha palju rohkem uurimistööd.
2. Seni võib järgida põhitekstis (peatükk C.10-A) kirjeldatud meetodit, aga ainult esmase biolagundatavuse puhul, kasutades sobivalt väikseid kontsentratsioone ($< 100 \mu\text{g/l}$) ja valideeritud analüüsimeetodit. Kui võetakse arvesse ka abiootilisi protsesse (adsorptsioon, lendumine jne), võib arvutada biolagundatavuse protsendi (vt käesoleva katsemeetodi punkt 54). Näitena võib kasutada Nyholmi ja tema kolleegide uuringut (1, 2), milles uuritavat kemikaali lisati neljatunnise tsükliga täitmise ja tühjendamise süsteemi (*fill and draw system*). Nad teatasid pseudo-esimese järgu kineetilised konstandid viie kemikaali jaoks, mis lisati sünteetiliselt reovette kontsentratsioonil 5–100 $\mu\text{g/l}$. (Täieliku biolagundatavuse jaoks võib kasutada ^{14}C märgistusega uuritavaid kemikaale.) Selle kirjeldamine jääb käesolevast katsemeetodist välja, kuna seni puuduvad kinnitatud meetodid, kuigi ISO 14592 (3) jaoks välja pakutud meetod sisaldab suuniseid ^{14}C märgistusega kemikaalide kasutamise kohta.

Poolpidev aktiivmudatest

3. Hiljem pakuti välja lihtsam kahest etapist koosnev katse (4, 5, 6); poolpideva aktiivmudatesti (SCAS testi) meetodile järgnevad lühiajalised kineetilised katsed poolpideva aktiivmudatesti seadmetest võetud proovidega. Poolpideva aktiivmudatesti süsteemi käitatakse muda kõrvaldamise teadaoleva määraga (erinevalt algsest katsemeetodist C.12) ja sinna lisatakse muudetud OECD sünteetilist reovett või olmereovett. Sünteetilist reovett muudeti (pH muutumise ja muda halva settivuse tõttu) ning lisati puhverdamiseks fosfaati, pärmiekstrakti, raud(III)kloriidi ja mikroelementide soolasisid; selle keemiline hapnikutarve suurendati ligikaudu väärtuseni 750 mg/l peptooni ja lihaekstrakti kontsentratsiooni suurendamisega. Seadmeid käitati 24-tunnise tsükliga: aeratsioon 23 tunni vältel, muda kõrvaldamine, settimine, supernatandi (väljavoolu) kõrvaldamine, millele järgnes sünteetilise reovee lisamine ja uuritava kemikaali lisamine kuni kontsentratsioonini 100 $\mu\text{g/l}$ (s.o. ligikaudu samal kontsentratsioonil, mida kasutati kiirkatses). Kord nädalas vahetati 10 % mudakogusest värske muda vastu, et säilitada tasakaalustatud mikroobipopulatsiooni.
4. Uuritava kemikaali kontsentratsiooni mõõdetakse alguses ja aeratsiooni lõpus ning katset jätkatakse, kuni saavutatakse uuritava kemikaali konstantne kiirusega kõrvaldamine; selleks võib kuluda üks nädal kuni mitu kuud.

Kiirkatse

5. Uuritava kemikaali lagunemise pseudo-esimest järku kiiruskonstandi määramiseks teadaoleva, kuid erineva päritolu ja varasema kasutusega aktiivmudas kasutatakse kiirkatset (näiteks kaheksa tundi). Aklimatiseerumiskatse ajal (punktid 3 ja 4) võetakse poolpideva aktiivmudatesti reaktoritest muda proovid (aeratsiooni ajavahemiku lõpus, kui orgaanilise substraadi kontsentratsioon on väike). Võrdluseks võib võtta ka muda paralleelsest poolpideva aktiivmudatesti seadmetest, mis ei ole uuritava kemikaaliga kokku puutunud.

▼ M4

Muda segusid lisatud uuritava kemikaaliga (kaks või enam kontsentratsiooni vahemikus 1–50 µg/l) aereeritakse ilma sünteetilist reovett või muud orgaanilist substraati lisamata. Lahusesse alles jäänud uuritav kemikaal määratakse korrapäraste ajavahemike järel, näiteks iga tund, olenevalt kemikaali lagunemise kiirusest, kuni 24 tunni jooksul. Enne sobiva analüüsimeetodi kasutamist proovid tsentrifugeeritakse.

Arvutused

6. Poolpideva aktiivmudatesti seadmetega saadud andmeid kasutatakse uuritava kemikaali kõrvaldamise protsendi arvutamiseks (punkt 54). Samuti saab arvutada keskmise kiiruskonstandi K_1 (mis on hõljuvaine kontsentratsiooni järgi normaliseeritud) järgmisest võrrandist:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/g \text{ h})$$

kus

t = aeratsiooniaeg (23 h)

C_e = kontsentratsioon aeratsiooniaja lõpus (µg/l)

C_i = kontsentratsioon aeratsiooni alguses (µg/l)

SS = aktiivmuda tahkete osakeste kontsentratsioon (g/l)

7. Kiirkatses koostatakse uuritava kemikaali allesoleva kontsentratsiooni log% ajast sõltuvuse graafik ning graafiku alguse (10–50 % lagunemist) tõus on võrdväärne pseudo-esimest järku kiiruskonstandiga K_1 . Konstant normeeritakse muda tahkete osakeste kontsentratsiooniga: tõus jagatakse läbi muda tahkete osakeste kontsentratsiooniga. Teatatud tulemus peab samuti sisaldama andmeid uuritava kemikaali ja hõljuvaine lähtekontsentratsioonide, muda retentsiooniaja, muda koguse ja päritolu kohta ning uuritava kemikaaliga eelneva kokkupuute kohta (kui see on toimunud).

Tulemuste hajuvus

8. Tulemuste hajuvust ja muid biolagundamise kineetika tahke arutati hiljutises keskkonnatoksikoloogia ja -keemia ühingu õpikojas (7). Neist avaldatud ja kavandavatest uuringutest peaks saama selgema arusaama reoveepuhastites toimivast kineetikast, mis lubab olemasolevaid andmeid paremini tõlgendada ning tulevasi katsemeetodeid paremini kavandada.

KIRJANDUS

- 1) Nyholm N, Jacobsen BN, Pedersen BM, Poulsen O, Dambourg A and Schultz B (1992). Removal of micropollutants in laboratory activated sludge reactors. Biodegradability. Wat. Res. 26: 339–353.
- 2) Jacobsen BN, Nyholm N, Pedersen BM, Poulsen O, and Ostfeldt P (1993). Removal of organic micropollutants in laboratory activated sludge reactors under various operating conditions: Sorption. Wat. Res. 27: 1505–1510.
- 3) ISO 14592 (ISO/TC 147/SC5/WG4, N264) (1998). Water Quality - Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations in water.

▼ M4

- 4) Nyholm N, Ingerslev F, Berg UT, Pedersen JP and Frimer-Larsen H (1996). Estimation of kinetic rate constants for biodegradation of chemicals in activated sludge waste water treatment plants using short-term batch experiments and $\mu\text{g/l}$ range spiked concentrations *Chemosphere* 33 (5): 851–864.
- 5) Berg UT and Nyholm N (1996). Biodegradability simulation Studies in semi-continuous activated sludge reactors with low ($\mu\text{g/l}$ range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711–735.
- 6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. Min. of Env. and Energy, Copenhagen.
- 7) Biodegradation kinetics: Generation and use of data for regulatory decision making (1997). Workshop at Port Sunlight, UK. Eds. Hales, SG. Feitjel, T. King, H. Fox, K. and Verstraete, W. 4–6th Sept. 1996. SETAC- Europe, Brussels.

▼ **M4****C.10-B: biokiled**

SISSEJUHATUS

1. Simulatsioonikatseid kasutatakse enamasti selliste kemikaalide puhul, mis kiire biolagundatavuse sõelumiskatse (käesoleva lisa peatüki C.4 meetodid C.4-A kuni C.4-F (9)) kohaselt ei ole kiiresti biolagundatavad, kuid mis on siiski iseeneslikult biolagunevad. Erandkorras kasutatakse simulatsioonikatset ka iga kemikaali puhul, mille kohta on vaja rohkem teavet, eelkõige masstootmises olevate kemikaalide puhul, ja tavaliselt kasutatakse aktiivmuda katset (C.10-A). Mõnel juhul vajatakse siiski konkreetset teavet kemikaali käitumise kohta biokiledega seotud reovee puhastamise meetodite puhul, eelkõige nõrgfiltrite, pöörlevate bioloogiliste kontaktseadmete ja keevkihttehnoloogiate puhul. Selle vajaduse täitmiseks on välja töötatud mitmesugused vahendid.
2. Gerike *et al.* (1) kasutasid suuri pooltööstuslikke nõrgfiltreid ühendatud režiimis. Need filtrid võtsid palju ruumi ja vajasis suhteliselt palju reovett või sünteetilist reovett. Truesdale *et al.* (2) kirjeldasid väiksemaid filtreid (läbimõõduga 6 jalga × 6 tolli), millesse lisati pindaktiivseid aineid mitte sisaldavat naturaalselt reovett, kuid nende jaoks oli siiski vaja suhteliselt suuri reoveekoguseid. Valmis (küpse) biokile loomiseks kulus 14 nädalat ning pärast pindaktiivse uuritava aine esmakordset lisamist kulus veel 4–8 nädalat, enne kui biokile oli aklimatiseerunud.
3. Baumann *et al.* (3) töötasid välja palju väiksema filtri, milles biokilet toetava inertse kasvukeskkonnana kasutati eelnevalt aktiivmudas immutatud nn polüesterfliisi. Uuritavat kemikaali kasutati ainsa süsinikuallikana ja biolagundatavust hinnati sissevoolu ja väljavoolu lahustunud orgaanilise süsiniku mõõtmise teel ning väljunud gaasis CO₂ koguse hindamise alusel.
4. Hoopis erinevat lähenemisviisi kasutasid Gloyna *et al.* (4), kes leiutasid pöörleva torureaktori. Pöörleva toru sisepinnal kasvatati teadaoleval pindalal biokile, lastes läbi horisontaalsuuna suhtes väikese nurga all oleva toru ülemise osa kaudu lisatavat sissevoolu. Reaktorit on kasutatud pindaktiivsete ainete biolagundatavuse uurimiseks (5) ning samuti biokile optimaalse paksuse ja läbi kile difusiooni uurimiseks (6). Viimati nimetatud autorid arendasid reaktorit edasi, muu hulgas täiustades seda väljuvas gaasis CO₂ määramise võimaldamiseks.
5. Pöörleva torureaktori kinnitas analüütikute alaline komitee (Ühendkuningriik) kui standardmeetodi, millega hinnatakse kemikaalide biolagundatavust (7) ning reovete puhastatavust ja mürgisust (8). Siin kirjeldatud meetodi eelised on lihtsus, kompaktsus, korratavus ja orgaanilise kasvukeskkonna suhteliselt väikse koguse kasutamine.

KATSE PÕHIMÕTE

6. Kaldul oleva aeglaselt pöörleva toru sisepinnale lisatakse sünteetilist või olmereovett ja uuritavat kemikaali kas seguna või eraldi. Sisepinnale tekib mikroorganismide kiht, mis on samaladne biofiltrites esinevaga. Reaktori kasutamise tingimused valitakse sellised, et tagada orgaanilise aine piisav kõrvaldamine ja vajaduse korral ammooniumi oksüdeerumine.

▼ **M4**

7. Väljavool torust kogutakse ja kas seatakse ja/või filtritakse enne lahustunud orgaanilise süsiniku ja/või uuritava kemikaali analüüsimist spetsiifilise meetodi abil. Samal ajal ja samadel tingimustel käitatakse võrdluseks kontrollkatse seadmeid, kuhu uuritavat kemikaali ei lisata. Katse- ja kontrollseadmete väljavoolus ilmnev lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni erinevus on eeldatavasti põhjustatud uuritavast kemikaalidest ja selle orgaanilistest metaboliitidest. Seda erinevust võrreldakse lisatud uuritava kemikaali kontsentratsiooniga (väljendatud lahustunud orgaanilise süsinikuna), et arvutada uuritava kemikaali kõrvaldamine.
8. Biolagunemist on bioadsorptsioonist üldiselt võimalik eristada nii, et uuritakse hoolikalt kõrvaldamismäära ajast sõltuvuse graafikut. Tavaliselt saab seda kinnitada kiire biolagundatavuse katsega (hapniku sidumine või süsinikdioksiidi tekkimine), kasutades aklimatiseeritud inokulumi, mis on võetud katse lõpus nendest reaktoritest, kuhu on lisatud uuritavat kemikaali.

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

9. Tulemuste õigeks tõlgendamiseks peaksid olema teada uuritava kemikaali puhtus, vees lahustuvus ning lenduvuse ja adsorptsiooniga seotud omadused.
10. Lenduvaid ja halvasti lahustuvaid kemikaale ei ole tavaliselt võimalik katsetada ilma erimeetmeid võtmata (vt peatüki C.10-A 5. liide). Samuti peaks olema teada keemiline struktuur või vähemalt empiiriline valem, et arvutada teoreetilised väärtused ja/või kontrollida parameetrite mõõdetud väärtusi, nagu teoreetiline hapnikutarve, lahustunud orgaaniline süsinik.
11. Sobiva katsekonsentratsiooni valimisel võivad abiks olla andmed uuritava kemikaali mürgisuse kohta mikroorganismidele (vt peatüki C.10-A 4. liide); väikeste biolagundamise väärtuste õigeks tõlgendamiseks on need hädavajalikud.

KÜNNISVÄÄRTUSED

12. Algul nõuti pindaktiivse kemikaali turule lubamiseks vähemalt 80 % esmast biolagundatavust. Kui 80 % künniseni ei jõuta, võib kohaldada kõnealust simulatsiooni (kinnitavat) katset ja pindaktiivset ainet võib turustada ainult juhul, kui rohkem kui 90 % konkreetsest kemikaalidest kõrvaldatakse. Kemikaalide puhul üldiselt ei teki vastuvõetavuse/vastuvõetamatuse taseme küsimust ja saavutatud kõrvaldamise protsentväärtust võib kasutada tõenäolise keskkonnakontsentratsiooni ligikaudsetes arvutustes, mida kasutatakse kemikaalidest põhjustatud ohu hindamiseks. Puhaste kemikaalide mitmes uuringus leiti, et olulises ulatuses biolagunevatest kemikaalidest rohkem kui kolme neljandiku puhul on lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr > 90 % ning sellistest kemikaalidest rohkem kui 90 % puhul on see > 80 %.

VÕRDLUSKEMIKAALID

13. Katse nõuetekohaseks tegemiseks on kasulik teha aeg-ajalt katseid võrdluskemikaalidega, mille käitumine on teada. Kõnealused kemikaalid on näiteks adipiinhape, 2-fenüülfenool, 1-naftool, difeenhape ja 1-naftoehape.

KATSETULEMUSTE REPRODUTSEERITAVUS

14. Ühendkuningriigi labor leidis, et katsete suhteline standardhälve ühes laboris oli 3,5 % ja katsete vahel 5 % (7).

▼ **M4****MEETODI KIRJELDUS****Seadmed***Pöörlevad torureaktorid*

15. Seade (vt 8. liite joonised 1 ja 2) koosneb akrüülitorude komplektist, milles iga toru pikkus on 30,5 cm ja siseläbimõõt 5 cm; torud asuvad kummiümbrisega ratastel, mis paiknevad metallist tugiraamis. Igal torul on ligikaudu 0,5 cm võrra välja ulatuv äärik, et toru püsiks ratastel. Sisepind on muudetud jämeda traatvillaga karedamaks ning ülemises (sissevoolu) otsas 0,5 cm võrra välja ulatuv sisemine äärik, mis hoiab vedelikku torus. Torud on rõhtasendi suhtes ligikaudu ühekraadise nurga all, et saavutada uuritava keskkonna läbi puhta toru suunamisel vajalik kokkupuuteaeg. Kummiümbrisega rattaid pööratakse aeglase reguleeritava kiirusega mootori abil. Torude temperatuuri reguleeritakse sellega, et seade asub püsiva temperatuuriga ruumis.
16. Kui iga torureaktor pannakse mõnevõrra suuremasse korgiga torusse ja tagatakse ühenduste õhutihedus, on võimalik koguda väljuv gaasiline CO₂ hiliemaks määramiseks leeliselahusesse (6).
17. Iga toru jaoks hoitakse 20 l nõus (A) (vt joonis 2) 24-tunnist orgaanilise kasvukeskkonna varu, vajaduse korral koos lisatud uuritava kemikaaliga. Vajaduse korral võib eraldi doseerida uuritava kemikaali lahust. Iga sellise nõu põhja lähedal on väljalase, mis on sobiva (näiteks silikoonkummist) toru ja peristaltilise pumba (B) kaudu ühendatud klaasist või akrüülist pealevoolutoruga, mis ulatub 2–4 cm võrra kalduoleva toru ülemise (pealevoolu) otsa (C) sisse. Väljavoolul lastakse kallutatud toru alumisest otsast tilkuda, et koguda see teise nõusse (D). Väljavoolu seatakse või filtritakse enne analüüsi tegemist.

Filtrimisseade-tsentrifüug

18. Proovide filtrimiseks mõeldud seade, milles on sobiva poorsuurusega (ava nominaalläbimõõt 0,45 µm) membraanfiltrid, mis adsorbeerivad orgaanilised kemikaalid ja millest vabaneb võimalikult vähe orgaanilist süsinikku. Kui kasutatakse filtreid, millest vabaneb orgaanilist süsinikku, tuleb filtreid hoolikalt pesta kuuma veega, et eemaldada väljahutatav orgaaniline süsinik. Selle asemel võib kasutada tsentrifuugi, mis tagab 40 000 m/s².
19. Seadmed, mis on vajalikud järgmise kindlaksmääramiseks:
 - lahustunud orgaaniline süsinik, orgaanilise süsiniku kogusisaldus või keemiline hapnikutarve;
 - konkreetne kemikaal, kui nõutakse selle määramist (kõrgefektiivne vedelikkromatograafia, gaaskromatograafia jne);
 - pH, temperatuur, happelisus ja leeliselisus;
 - ammonium, nitrit ja nitraat, kui katse tehakse nitrifikatsiooni tingimustes.

Vesi

20. Kraanivesi, mis sisaldab vähem kui 3 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku.
21. Destilleeritud või deioniseeritud vesi, mis sisaldab vähem kui 2 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku.

▼ **M4***Orgaaniline kasvukeskkond*

22. Orgaanilise kasvukeskkonnana võib kasutada sünteetilist reovett, olmereovett või nende segu. On tõendatud, et ainult olmereovee kasutamisel saadakse sageli suurem lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise protsent (aktiivmuda seadmetes) ning sellest saab biolagundada isegi mõnd sellist kemikaali, mis ei ole OECD sünteetilise reovee kasutamisel biolagundatav. Seega on soovitatav kasutada olmereovett. Lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni (või keemilist hapnikutarvet) tuleb mõõta igas uues orgaanilise kasvukeskkonna partiis. On vaja teada orgaanilise kasvukeskkonna happelisust või leeliselisust. Kui kasvukeskkonna happelisus või leeliselisus on väike, võib see vajada sobiva puhvri lisamist (naatriumvesinikkarbonaat või kaaliumvesinikfosfaat), et hoida katse ajal reaktoris pH väärtus ligikaudu $7,5 \pm 0,5$. Lisatava puhvri kogus ja lisamise aeg tuleb otsustada igal juhul eraldi.

Sünteetiline reovesi

23. Ühes liitris kraanivees lahustatakse 160 mg peptooni, 110 mg lihaekstrakti; 30 mg karbamiidi, 28 mg veevaba dikaaliumvesinikfosfaati (K_2HPO_4), 7 mg naatriumkloriidi (NaCl), 4 mg kaltsiumkloriidihüdraati ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), 2 mg magneesiumsulfaatheptahüdraati ($Mg_2SO_4 \cdot 7H_2O$). See OECD sünteetiline reovesi on näidis ja selle keskmine lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon sissevoolus on ligikaudu 100 mg/l. Alternatiivselt võib kasutada muid koostisi, millel on ligikaudu sama lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon ja mis on pärisreoveega sarnasemad. Kõnealuse sünteetilise reovee kontsentradi võib valmistada destilleeritud veega ja hoida kuni ühe nädala temperatuuril 1 °C. Vajaduse korral lahjendatakse seda kraaniveega. (See kasvukeskkond ei ole rahuldav, näiteks lämmastiku kontsentratsioon on väga suur ja süsinikusisaldus on suhteliselt väike, kuid midagi paremat pole soovitatud, kuid kasvukeskkonna parandamiseks on soovitatud üksnes lisada puhvrina suuremas koguses fosfaati ja rohkem peptooni).

Olmereovesi

24. Kasutage värskest settinud reovett, mida kogutakse iga päev peamiselt olmereovett töötlevast veepuhastuskäitisest. Seda tuleks koguda esmase seadmise paagi ülevoolu kanalist või aktiivmudapuhasti sissevoolust ja see peaks üldiselt olema ilma suurte osakesteta. Seda reovett saab enne kasutamist hoida mitu päeva temperatuuril ligikaudu 4 °C, kui tõendatakse, et lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus (või keemiline hapnikutarve) ei ole hoidmise ajal oluliselt vähenenud (s.o vähem kui 20 %). Süsteemi häirimise vähendamiseks tuleks igas uues partiis viia lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) enne kasutamist sobivale konstantsele väärtusele näiteks kraaniveega lahjendamise teel.

Määrdeaine

25. Peristaltilise pumba rullikute määrimiseks võib kasutada glütserooli või oliiviõli: mõlemad on sobivad silikoonkummist torudega kasutamiseks.

Uuritava kemikaali põhilahused

26. Kui kemikaal on piisavalt lahustuv, valmistage sobiva kontsentratsiooniga põhilahus (näiteks 1–5 g/l) deioniseeritud vees või sünteetilise reovee mineraalse osas. Lahustumatu kemikaali kohta vt peatüki C.10-A 5. liide. Seda meetodit ei saa torureaktoreid muutmata (punkt 16) kasutada lenduva kemikaali puhul. Määrake põhilahuses lahustunud orgaaniline süsinik ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus ning korrake mõõtmisi iga uue partii korral. Kui lahustunud orgaanilise süsiniku ja orgaanilise süsiniku kogusisalduse erinevus on suurem kui 20 %, siis kontrollige uuritava kemikaali lahustuvust

▼ **M4**

vees. Võrrelge lahustunud orgaanilist süsinikku või uuritava kemikaali kontsentratsiooni, mis on mõõdetud põhilahuses spetsiifilise analüüsimeetodi abil, nimiväärtusega, et näha, kas määramise saagis on piisavalt hea (tavaliselt võib eeldada $> 90\%$). Veenduge (eelkõige dispersiooni korral), kas lahustunud orgaanilist süsinikku saab kasutada analüüsiparameetrina või tuleb kasutada ainult spetsiifilist analüüsimeetodit, millega saab määrata uuritavat kemikaali. Dispersiooni puhul tuleb proovid tsentrifuugida. Iga uue partii puhul määrake lahustunud orgaaniline süsinik, keemiline hapnikutarve või uuritav kemikaal spetsiifilise analüüsimeetodi abil.

27. Määrake põhilahuse pH. Äärmuslikud väärtused osutavad, et kemikaali lisamine võib mõjutada aktiivmuda pH-d katsesüsteemis. Sel juhul neutraliseerige põhilahust väikse koguse anorgaanilise happe või alusega, et pH oleks $7 \pm 0,5$, kuid vältige uuritava kemikaali sadestamist.

KATSE KÄIK*Orgaanilise kasvukeskkonna doseerimine*

28. Hoolitsege, et kõik sissevoolu- ja väljavoolunõud ning sissevoolunõud väljuv ja väljavoolunõusse sisenev toru on korralikult puhastatud, et seal katse alguses ja kogu katse vältel ei kasvaks mikroobe.
29. Valmistage värske sünteetiline reovesi (punkt 23) iga päev kas tahketest lähteainetest või kontsenteeritud põhilahusest, lahjendades seda vajaliku koguse kraaniveega. Mõõtke nõutav kogus silindriga välja ja viige see puhtasse sissevoolunõusse. Vajaduse korral lisage sünteetilisse reovette enne lahjendamist ka vajalik kogus uuritava kemikaali või võrdluskemikaali põhilahust. Kui nii on mugavam või saab sellega vältida uuritava kemikaali kadusid, siis valmistage eraldi mahutis uuritava kemikaali lahjendatud lahus ja sisestage see eraldi teise doseerimispumba abil kaldega torusse.
30. Teise võimalusena (ja eelistatavalt) kasutage settinud olmereovett (punkt 24), mis kogutakse võimaluse korral iga päev uuesti.

Pöörlevate torureaktorite käitamine

31. Ühe uuritava kemikaali hindamiseks vajatakse kahte identset torureaktorit ja need seatakse üles püsiva temperatuuriga ruumis, tavaliselt $22 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$.
32. Reguleerige peristaltilisi pumpasid, et need pumpaksid orgaanilist kasvukeskkonda (ilma uuritava kemikaalita; $250 \pm 25\text{ ml/h}$) kaldega torudesse, mida pööratakse kiirusel 18 ± 2 pööret minutis. Lisage pumba torudele katse alguses ja katse vältel regulaarselt määrdeainet (punkt 25), et tagada korralik toimimine ja pikendada torude kasutusiga.
33. Reguleerige torude kalle rõhtasendi suhtes nii, et sissevoolulahus viibiks puhtas torus $125 \pm 12,5\text{ s}$. Hinnake viibimisaeg sissevoolu mittebioloogilise markeri (näiteks NaCl, inertse värvaine) lisamise teel: keskmiseks viibimisaegaks arvestatakse väljavoolus tippkontsentratsioonini jõudmiseks vajalikku aega (kui on tekkinud maksimaalne kile, võib viibeag suurened kuni ligikaudu 30 minutini).
34. Selliste määrade, kiiruste ja aegade juures on täheldatud piisavat lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamist ($> 80\%$) ning nitrifitseeritud väljavoolu tekkimist. Kui kõrvaldamine ei ole piisav või kui tuleb simuleerida konkreetse puhasti tulemusi, tuleks voolukiirust muuta. Viimati nimetatud juhul reguleerige orgaanilise kasvukeskkonna doseerimise kiirust, kuni reaktori töö tulemuslikkus vastab puhasti töö tulemuslikkusele.

▼ **M4***Inokulatsioon*

35. Kui kasutatakse sünteetilist reovett, võib mikroorganismide kasvu algatamiseks piisata õhukaudsest inokulatsioonist, vastasel juhul aga lisage sisestusse kolme päeva jooksul 1 ml/l settinud reovett.

Mõõtmised

36. Kontrollige korrapäraste ajavahemike järel, et doosimäärad ja pöörlemiskiirused oleksid vajalikes piirides. Samuti mõõtke väljavoolu pH-d, eelkõige siis, kui eeldatakse nitrititseeerimist.

Proovide võtmine ja analüüsimine

37. Proovide võtmise meetod, skeem ja sagedus valitakse katse eesmärgi järgi. Näiteks võib sissevoolust ja väljavoolust võtta hetkeproove (*snap/grab*) või koguda proov pikema aja, näiteks kolme kuni kuue tunni vältel. Esimesel ajavahemikul, mil uuritavat kemikaali veel sees ei ole, võtke proove kaks korda nädalas. Filtrige proovid läbi membraanide või tsentrifuugige neid kiirusel ligikaudu 40 000 m/s² umbes 15 minutit (punkt 18). Enne läbi membraanide filtrimist võib olla vajalik lasta proovidel settida ja/või neid jämfeltriga filtrida. Määrake lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarve) vähemalt kaks korda ning vajaduse korral ka biokeemiline hapnikutarve, ammoonium ja nitrit/nitraat.
38. Kõik analüüsid tuleks teha pärast proovide kogumist ja ettevalmistamist võimalikult kiiresti. Kui analüüsid tuleb edasi lükata, säilitage proove tihe-
dalt suletud pudelis pimedas ja temperatuuril ligikaudu 4 °C. Kui proove tuleb säilitada kauem kui 48 tundi, kasutage säilitamiseks sügavkülmutamist, hapestamist või sobiva mürgise kemikaali lisamist (näiteks 1 liitri kohta 20 ml elavhõbe(II)kloriidi lahuse (10 g/l) lisamisega). Kontrollige, et säilitamis-
meetod ei mõjutaks analüüsi tulemusi.

Sissetöötamisperiood

39. Sellel ajavahemikul kasvab pinna biokile optimaalse paksuseni, milleks kulub tavaliselt ligikaudu kaks nädalat ja milleks ei tohiks kuluda üle kuue nädala. Lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamine (punkt 44) (või keemiline hapnikutarve) suureneb ja jõuab tasakaaluoleku väärtuseni. Kui torudes on jõutud sarnaste platooväärtusteni, valitakse üks toru ülejäänud katse vältel kontrollseadmena kasutamiseks ning sel ajal peaks torude tõhusus püsivaks jääma.

Uuritava kemikaali lisamine

40. Sellel etapil lisage vajaliku kontsentratsiooniga (tavaliselt 10–20 mg C/l) uuritavat kemikaali teise reaktorisse. Kontrollseadmesse lisatakse jätkuvalt ainult orgaanilist kasvukeskkonda.

Aklimatiseerumise ajavahemik

41. Jätkake lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) analüüside tegemist kaks korda nädalas ja esmase biolagundatavuse hindamiseks mõõtke ka uuritava kemikaali kontsentratsiooni spetsiifilise analüüsimeetodi abil. Laske süsteemil pärast uuritava kemikaali esmakordset lisamist üks kuni kuus nädalat (või eritingimustes pikemalt) aklimatiseeruda. Kui kõrvaldamise protsent (punktid 43–45) jõuab maksimumväärtuseni, mõõtke keskmise kõrvaldamisprotsendi hindamiseks platoofaasist ligikaudu kolme nädala vältel 12–15 kehtivat väärtust. Katse loetakse lõpetatuks, kui jõutakse piisavalt suure kõrvaldamise määraneni. Pärast uuritava kemikaali esmakordset lisamist ei peaks katse kestus tavaliselt ületama 12 nädalat.

▼ **M4***Kile irdumine*

42. Torust liigse kile suures koguses äkiline irdumine (*sloughing*) toimub suhteliselt korrapärase ajavahemiku järel. Selleks et kile irdumine ei mõjutaks tulemuste võrreldavust, peaks katse kestma vähemalt kaks täielikku kasvamise ja irdumise tsüklit.

ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

43. Arvutage uuritava kemikaali lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamise protsent igal etteantud ajal järgmise võrrandi abil:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_o)]/C_s \%$$

kus

D_t = lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamise protsent ajal t ;

C_s = uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kontsentratsioon sissevoolus, mida hinnatakse eelistatavalt põhilahuse kontsentratsiooni ja selle lisatud koguse alusel (mg/l);

E = katse väljavoolus ajal t mõõdetud lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) väärtus (mg/l);

E_o = kontrollseadme väljavoolus ajal t mõõdetud lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) väärtus (mg/l).

Kui katsetatakse ka võrdluskemikaali, tehakse sama arvutus ka võrdluskemikaaliga.

Kontrollreaktori tõhusus

44. Kontrollreaktori poolt orgaanilise kasvukeskkonna lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamise määr (D_B) on kasulik teave, mis aitab hinnata katse ajal biokile biolagundamise aktiivsust. Arvutage kõrvaldamise protsent järgmise võrrandi alusel:

$$D_B = 100 (1 - E_o/C_m) \%$$

kus

C_m = lahustunud orgaaniline süsinik (või keemiline hapnikutarbe) kontrollseadme sissevoolu orgaanilises kasvukeskkonnas (mg/l).

45. Arvutage spetsiifilise analüüsimeetodiga uuritava kemikaali kõrvaldamine (D_{ST}) (kui seda mõõdetakse) igal hindamisajal järgmise võrrandi abil:

$$D_{ST} = 100 (1 - S_e/S_i) \%$$

kus

S_i = uuritava kemikaali mõõdetud või, eelistatavalt, hinnatud kontsentratsioon katse sissevoolus (mg/l);

S_e = uuritava kemikaali mõõdetud kontsentratsioon katse väljavoolus ajal t (mg/l).

▼ M4

Kui analüüsimetod annab muutmata reovees positiivse näitaja (S_c , mg/l), siis arvutage kõrvaldamise protsent (D_{SC}) järgmise võrrandi alusel:

$$D_{SC} = 100(S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c) \%$$

Katsetulemuste esitamine

46. Koostage kõrvaldamise protsendi D_t ja D_{ST} (või D_{SC}) (kui see on leitud) graafiline sõltuvus ajast (vt peatüki C.10-A 2. liide). Võtke platoofaasis määratud 12–15 D_T (ja D_{ST} , kui see on määratud) väärtustest uuritava kemikaali kõrvaldamise protsendi keskmine (väljendatud lähima täisarvuna) ja leidke standardhälve. Kõrvaldamise kõvera kujust saab teha järeldusi kõrvaldamises osalevate protsesside kohta.

Adsorptsioon

47. Kui uuritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määr on suur kohe katse alguses, kõrvaldatakse uuritavat kemikaali tõenäoliselt biokilele adsorbeerimise teel. Seda võib olla võimalik tõendada irdunud kilest tahketele osakestele adsorbeerunud uuritava kemikaali määramisega. Tavaliselt ei jää adsorbeeritavast kemikaalist tingitud lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamine suuremahuliseks kogu katse vältel; üldiselt toimub alguses suur kõrvaldamine, mis langeb järk-järgult tasakaaluväärtusele. Kui adsorbeeritud uuritav kemikaal suudab aga põhjustada mikroobide populatsiooni aklimatiseerumise, siis suureneb seejärel uuritava kemikaali lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamine ja jõuab kõrge platooväärtuseni.

Ootefaas

48. Nagu ka staatiliste sõelumiskatsete korral, nii vajavad mitmed uuritavad kemikaalid enne täieliku biolagunemise toimumist ootefaasi. Ootefaasis toimub kompetentsete bakterite aklimatiseerumine (või kohanemine) ja uuritavat kemikaali peaaegu ei kõrvaldata; seejärel toimub kõnealuste bakterite esialgne kasv. See faas lõpeb ja lagundamisfaasi alguseks loetakse hetke, kui ligikaudu 10 % uuritava kemikaali esialgsest kogusest on kõrvaldatud (võttes arvesse adsorptsiooni, kui see toimub). Ootefaasi pikkus võib olla väga erinev ja halvasti reprodutseeritav.

Platoofaas

49. Pidevas katses kõrvaldamist näitava kõvera platoofaas on määratletud kui faas, milles lagundamine on maksimaalne. See faas peaks kestma vähemalt kolm nädalat ja selle käigus tuleks mõõta ligikaudu 12–15 kehtivat näitajat.

Uuritava kemikaali keskmine kõrvaldamise määr

50. Arvutage uuritava kemikaali kõrvaldamise näitaja D_t (ja D_{st} , kui see on leitud) väärtuste alusel keskväärus platoofaasis. See on uuritava kemikaali kõrvaldamise määr ümardatuna lähima täisarvuni (1 %). Samuti soovitatakse arvutada keskvääruse 95 % usaldusvahemik. Arvutage samal viisil orgaanilise kasvukeskkonna keskmine kõrvaldamise määr (D_B) kontrollnõus.

▼ **M4****Biolagundamise tunnused**

51. Kui uuritav kemikaal biokile külge märkimisväärselt ei adsorbeeru ja kõrvaldamise kõveral on ootefaasi, lagundamis- ja platoofaasiga biolagundamise kõvera tavapärane kuju (punktid 48, 49), võib olla kindel, et mõõdetud kõrvaldamine on põhjustatud biolagundamisest. Kui on toimunud suuremahuline esialgne kõrvaldamine, siis ei suuda simulatsioonikatse eristada bioloogilise ja abiootilise kõrvaldamise protsesse. Sellistel juhtudel ja muudel juhtudel, kui biolagundamise suhtes tekivad kahtlused (näiteks kui toimub väljapuhumine (*stripping*)), tuleb analüüsida adsorbeerunud uuritavat kemikaali kile proovidel või teha täiendavad biolagundamise staatilised (sõelumis)katsed selgelt bioloogilisi protsesse näitavate parameetrite alusel. Kõnealused katsed on hapniku sidumise meetodid (käesoleva lisa peatüki C.4 meetodid C.4-D, C.4-E ja C.4-F) (9) või katse, millega mõõdetakse CO₂ tekkimist (käesoleva lisa peatüki C.4 meetod C.4-C või *Headspace*-meetod) (10), kasutades inokulumina asjaomase reaktori eelnevalt kokkupuutunud biokilet.
52. Kui mõõdetud on nii lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist kui ka konkreetse kemikaali kõrvaldamist, siis näitab kõrvaldamisprotsentide oluline erinevus (kui esimene nimetatutest on viimati nimetatust väiksem) orgaaniliste vahesaaduste olemasolu väljavoolus; selliseid vahesaadusi võib olla keerulisem lagundada ja neid tuleks uurida.

Katsetulemuste kehtivus

53. Katset võib pidada kehtivaks, kui lahustunud orgaanilise süsiniku (või keemilise hapnikutarbe) kõrvaldamise määr (D_B) kontrollseadmetes on kahe nädala möödumisel > 80 % ja ei ole täheldatud ebatavalisi asjaolusid.
54. Kui on katsetatud kiirelt biolagundatavat (võrdlus)kemikaali, peaks biolagunemise määr olema > 90 % ja paralleelide erinevus ei tohiks olla suurem kui 5 %. Kui need kaks kriteeriumi ei ole täidetud, tuleb katse käik läbi vaadata ja/või hankida olmereovesi muust allikast.
55. Samuti ei tohiks uuritavat kemikaali töötlevate paralleelseadmete (kui neid kasutatakse) biolagundamise näitajate erinevus olla suurem kui 5 %. Kui see kriteerium ei ole täidetud, aga kõrvaldamise määr on suur, siis jätkake analüüsi veel kolme nädala vältel. Kui kõrvaldamise määr on väike, kontrollige uuritava kemikaali inhibeerivat mõju, kui see ei ole teada, ja korrake katset uuritava kemikaali väiksemal kontsentratsioonil, kui see on teostatav.

Katseprotokoll

56. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

Uuritav kemikaal:

- tunnusandmed;
- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused.

Katsetingimused:

- katseüsteemi mis tahes muudatused, eelkõige lahustumatute või lenduvate ainetega katsete tegemisel;
- orgaanilise kasvukeskkonna tüüp;
- tööstuslike jäätmete osakaal reovees ja nende laad, kui neid kasutatakse ja need on teada;
- inokulatsioonimeetod;

▼ **M4**

- uuritava kemikaali põhilahus – lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus ja orgaanilise süsiniku kogusisaldus; suspensiooni korral selle valmistamisviis; kasutatav(ad) katsekontsentratsioon(id), kui lahustunud orgaaniline süsinik jääb vahemikust 10–20 mg/l väljapoole, siis selle põhjendus; lisamise meetod; esmakordse lisamise kuupäev; mis tahes muutused kontsentratsioonis;
- keskmine hüdrauliline retentsiooniaeg (ilma kasvuta); toru pöörlemiskiirus; ligikaudne kaldenurk, kui võimalik;
- andmed kile irdumise kohta; aeg ja intensiivsus;
- katsetemperatuur ja -vahemik;
- kasutatud analüüsimeetodid.

Katsetulemused:

- kõik mõõdetud andmed (lahustunud orgaaniline süsinik, keemiline hapnikutarve, uuritava kemikaali määramine spetsiifilise analüüsimeetodiga, pH, temperatuur, N-kemikaalid (kui see on asjakohane);
- kõik arvutatud D_t (või D_{tc}), D_B , D_s näitajad tabelite kujul ja kõrvaldamise kõverad;
- teave ootefaasi ja platoofaasi, katse kestuse, uuritava kemikaali, võrdluskemikaali (kui seda katses kasutati) ja orgaanilise kasvukeskkonna (kontrollseadmes) kõrvaldamise kohta koos statistilise teabe ja kinnitustega biolagundatavuse ja katse kehtivuse kohta;
- tulemuste arutelu.

KIRJANDUS

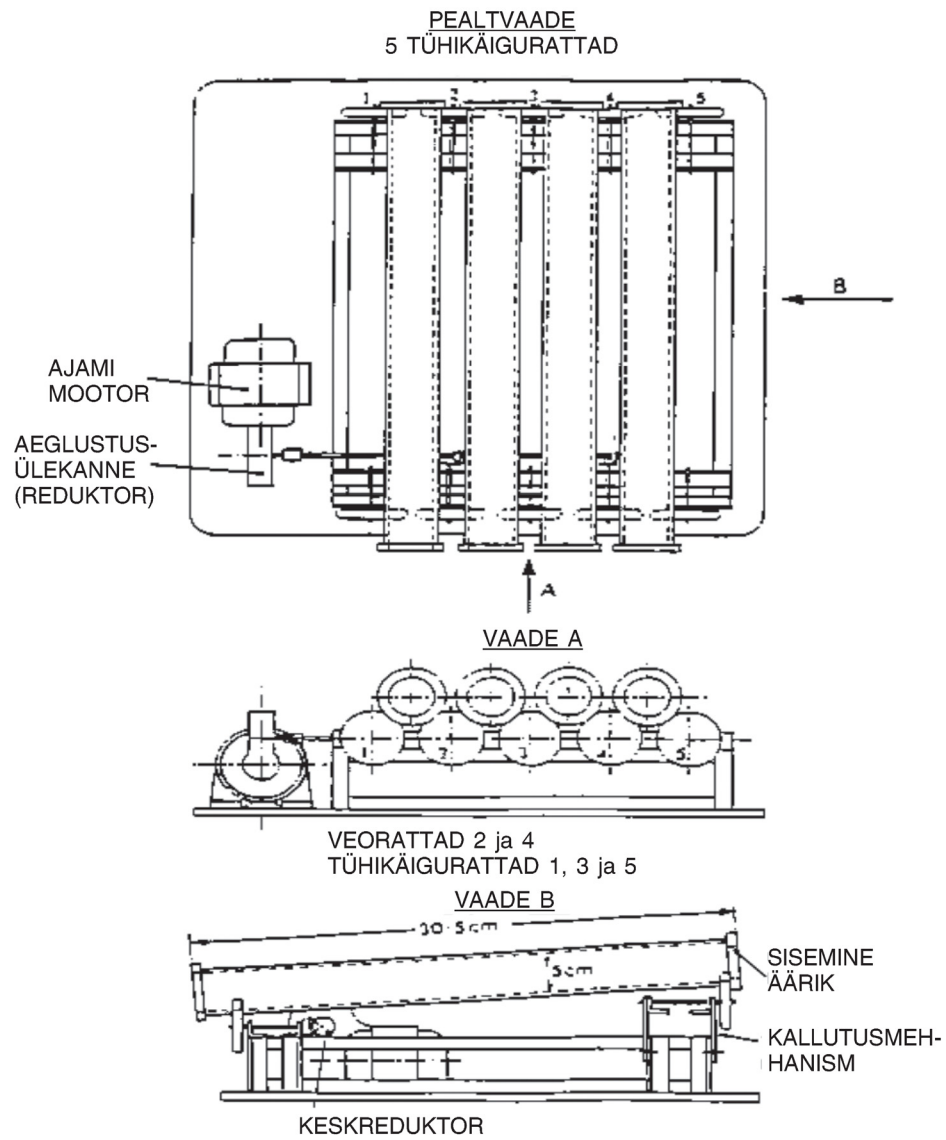
- 1) Gerike P, Fischer W, Holtmann W (1980). Biodegradability determinations in trickling filter units compared with the OECD Confirmatory Test. *Wat. Res.* 14: 753–758.
- 2) Truesdale GA, Jones K, Vandyke KG (1959). Removal of synthetic detergents in sewage treatment processes: Trials of a new biologically attackable material. *Wat. Waste Tr. J.* 7: 441–444.
- 3) Baumann U, Kuhn G and Benz M. (1998). Einfache Versuchsanordnung zur Gewinnung gewässerökologisch relevanter Daten, *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.* 10: 214–220.
- 4) Gloyna EF, Comstock RF, Renn CE (1952). Rotary tubes as experimental trickling filters. *Sewage ind. Waste* 24: 1355-1357.
- 5) Kumke GW, Renn CE (1966). LAS removal across an institutional trickling filter. *JAOCS* 43: 92–94.
- 6) Tomlinson TG, Snaddon DHM, (1966). Biological oxidation of sewage by films of micro-organisms. *Int.J. Air Wat. Pollut.* 10: 865–881.
- 7) Her Majesty's Stationery Office (1982). Methods for the examination of waters and associated materials. Assessment of biodegradability, 1981, London.
- 8) Her Majesty's Stationery Office (1984). Methods for the examination of waters and associated materials. Methods for assessing the treatability of chemicals and industrial waste waters and their toxicity to sewage treatment processes, 1982, London.
- 9) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine”, meetodid C.4-A kuni C.4-F.
- 10) ISO 14593 (1998). Water Quality-Evaluation in an aqueous medium of the ultimate biodegradability of organic substances. Method by analysis of released inorganic carbon in sealed vessels.

▼ **M4**

8. liide

Joonis 1

Pöörlevad torud



Sõnastik

Pealtvaade

Vaade A/B

Veorattad

Tühikäigurattad

Ajami mootor

Aeglustusülekanne (reduktor)

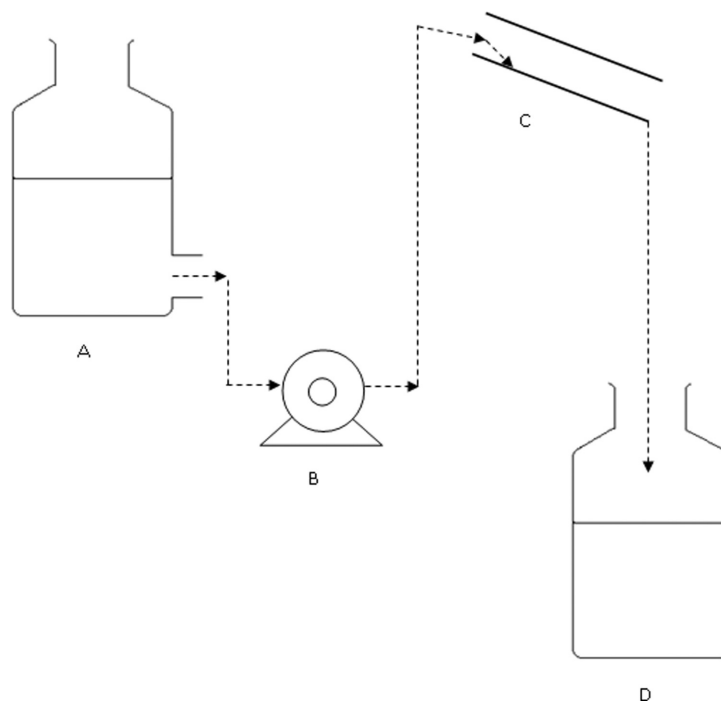
Sisemine äärik

Kallutusmehhanism

Keskreduktor

▼ **M4**

Joonis 2

Vooskeem

- A. Söötenõu
- B. Peristaltiline pump
- C. Pöörlev toru
- D. Väljavoolu kogumise nõu

MÕISTED

Uuritav kemikaal: iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

Kemikaalid: „tuleb silmas pidada, et mõistet „kemikaal” kasutatakse ÜRO keskkonna- ja arengukonverentsi lepingutes ja edasistes dokumentides laia mõistena, mis hõlmab aineid, tooteid, segusid, valmistisi või mis tahes muid mõisteid, mida võib olemasolevates süsteemides hõlmatuse märkimiseks kasutada”.

▼B**C.11. BIODEGRADATSIOON****AKTIIVMUDA RESPIRATSIOONI PÄRSSIMISE KATSE****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Kirjeldatud meetodiga määratakse uuritava aine mõju mikroorganismidele, mõõtes respiratsiooni intensiivsust uuritava aine erinevate kontsentratsioonide juures.

Selle meetodi eesmärk on saada kiire skriiningumeetod, millega kindlaks teha aineid, mis võivad kahjustavalt mõjuda aeroobsetele reoveepuhastitele, ja määrata sobivaid mitte-inhibeeriva toimega uuritava aine kontsentratsioone, mida saaks biodegradatsiooni testides kasutada.

Lõplikule testile eelneb sobiva vahemiku leidmise test. Selle tulemusena saab teavet kontsentratsioonivahemike kohta, mida põhikatses kasutada.

Uuringusse kaasatakse kaks kontrolli ilma uuritava aine sisalduseta, üks lisatakse katseseeria alguses ja teine lõpus. Samuti tuleb võrdlusainega kontrollida kõiki aktiivmuda partiisid.

See meetod on sobivaim ainete puhul, mis seoses oma veelahustuvuse ja väikese lenduvusega jäävad tõenäoliselt vette.

Uuritavas keskkonnas vähese lahustuvusega ainete puhul ei ole võimalik EC₅₀ määrata.

Hapniku omastamisel põhinevad tulemused võivad anda ekslikke tulemusi, kui uuritava aine puhul esineb kalduvus vabastavale oksüdatiivsele fosforülatsioonile.

Enne uuringu tegemist on kasulik teada järgmisi andmeid:

- vees lahustuvus;
- küllastunud aururõhk;
- struktuurvalem;
- uuritava aine puhtusaste.

Soovitused

Aktiivmuda võib sisaldada potentsiaalselt patogeenseid organisme, mistõttu tuleb seda käsitseda ettevaatlikult.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Respiratsiooni intensiivsus on hapniku tarbimine aeroobses mudas olevate reovee mikroorganismide poolt, mida väljendatakse tavaliselt O₂/mg muda kohta ühes tunnis.

▼B

Uuritava aine kindla kontsentratsiooni inhibeeriva toime arvutamiseks väljendatakse respiratsiooni intensiivsust kahe respiratsiooni intensiivsuse keskmise kontrollnäitaja protsendina:

$$\left(1 - \frac{2R_s}{R_{c1} + R_{c2}}\right) \times 100 = \text{inhibitsiooni protsent}$$

kus:

R_s = hapniku tarbimine katseaine uuritava kontsentratsiooni juures,

R_{c1} = hapniku tarbimine, kontroll 1,

R_{c2} = hapniku tarbimine, kontroll 2.

EC_{50} on käesoleva meetodi puhul uuritava aine kontsentratsioon, mille juures on respiratsiooni intensiivsus 50 % kontrolli puhul saavutatust kirjeldatud tingimuste juures.

1.3. VÕRDLUSAINED

Võrdlusainena soovitatakse kasutada tuntud respiratsiooni inhibeerivat ainet 3,5-dikloorfenooli ja seda määrata EC_{50} iga aktiivmuda partii puhul, et kontrollida, kas muda tundlikkus on normaalne.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Kunstliku muda standardsisaldusega aktiivmudas mõõdetakse respiratsiooni intensiivsust 30minutilise või kolmetunnise kokkupuuteaja järel (või mõlema järel). Samuti mõõdetakse sama aktiivmuda respiratsiooni intensiivsus erinevas kontsentratsioonis uuritava aine juuresolekul muidu samasuguste tingimuste juures. Uuritava aine pärssivat toimet kindla kontsentratsiooni juures väljendatakse protsendina kahe kontrolli keskmisest respiratsiooni intensiivsuse näitajast. EC_{50} näitaja arvutatakse erinevate kontsentratsioonide juures saadud näitajate põhjal.

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Uuringu tulemused kehtivad, kui

— erinevus kahe hingamise intensiivsuse kontrollnäitaja vahel on kuni 15 %;

— 3,5-dikloorfenooli EC_{50} (30 minutit ja/või kolm tundi) on ettenähtud vahemikus 5–30 mg/l.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. Reagendid

1.6.1.1. Uuritava ainega lahused

Uuritavat ainet sisaldavad lahused valmistatakse vahetult uuringu alguses põhilahusega. Kui järgitakse allpool kirjeldatud protseduuri, on põhilahuse sobivaks kontsentratsiooniks 0,5 g/l.

▼B1.6.1.2. *Kontrollaine lahus*

5,5-dikloorfenooli lahuse saab näiteks valmistada 0,5 g 3,5-dikloorfenooli lahustamisel 10 ml 1 M NaOH lahuses, saadud lahus lahjendatakse ligikaudu 30 ml destilleeritud veega, lisades samaaegselt segamisel 0,5 M H₂SO₄ kuni sademe tekke alguseni – vajalik võib olla ligikaudu 8 ml 0,5 M H₂SO₄ lahuse lisamine – ja lõpuks lahjendatakse segu destilleeritud veega kuni ühe liitrini. Saadud lahuse pH peaks olema vahemikus 7 kuni 8.

1.6.1.3. *Kunstlik reovesi*

Kunstlikul reoveel põhinev sööde valmistatakse järgnevas koguses ainete lahustamisel ühes liitris vees:

- 16 g peptooni;
- 11 g lihaekstrakti;
- 3 g ureat;
- 0,7 g NaCl;
- 0,4 g CaCl₂·2H₂O;
- 0,2 g MgSO₄·7H₂O;
- 2,8 g K₂HPO₄.

Märkus 1. Ära toodud kunstlik reovesi on 100 korda kontsentreeritud, kui kirjeldatud OECD tehnilise raporti peatükis „Soovitatud meetodid sünteetilistes detergentides kasutatavate surfaktantide biodegradeeruvuse kindlaks tegemiseks” (11. juuni 1976), lisatud on kaaliumdivesinikfosfaati.

Märkus 2. Kui valmistatud lahus ei kasutata kohe, tuleb seda säilitada pimedas ruumis temperatuuril 0–4 °C mitte kauem kui üks nädal tingimustes, mis ei põhjusta muutusi aine koostises. Samuti võib lahus enne säilitamist steriliseerida või lisada peptoon ja lihaekstrakt vahetult enne katse tegemist. Enne kasutamist tuleks lahus põhjalikult segada ja selle pH kohendada vastavalt nõuetele.

1.6.2. *Aparatuur*

Mõõteaparatuur: täpselt samasugune ülesehitus ei ole vajalik. Siiski peaks aparatuuril olema pealispind ja sond peaks tihedalt sobituma mõõtekolbi kaelaossa.

Vajalik on tavaline laborivarustus ja eelkõige järgmised seadmed:

- mõõteaparatuur;
- aeratsiooniseade;
- pH-elektrood ja mõõtmisvarustus;
- O₂-elektrood.

1.6.3. *Inokulaadi valmistamine*

Testi bakteriaalse inokulaadina kasutatakse aktiveeritud reovett, mis on pärit peamiselt olmereovett töötlevatest puhastussüsteemidest.

Vajaduse korral võib suuri osakesi eemaldada sadestamise teel, kui jätta lahus lühiajaliselt (näiteks 15 minutiks) seisma ja dekanteerida ülemine väiksemate osakestega kiht kasutamiseks. Teise võimalusena võib reovett segada blenderiga mõne sekundi jooksul.

▼B

Kui kahtlustatakse inhibeeriva toimega lisandite juuresolekut, tuleks muda loputada kraanivee või isotoonilise lahusega. Pärast tsentrifugimist supernatant eemaldatakse (seda protseduuri korratakse kolm korda).

Väike kogus muda kaalutakse välja ja kuivatatakse. Saadud tulemusest võib arvutada määrja muda koguse, mida tuleb segada veega, et vedelikusegus suspendeeritud tahke aine kontsentratsioon oleks vahemikus 2–4 g/l. Sellisel juhul saavutatakse eksperimentaalingimustes kontsentratsioonivahemik 0,8–1,6 g/l, tingimisel et järgitakse allpool soovitatud protseduuri.

Kui muda ei saa kasutada selle kogumise päeval, lisatakse 50 ml sünteetilist muda igale aktiivmuda kogusele, mis on valmistatud nagu eespool kirjeldatud; seda aereeritakse seejärel öö läbi 20 ± 2 °C ning aereerimist jätkatakse kogu päeva. Enne kasutamist tuleb kontrollida pH-d ja vajaduse korral kohandada väärtuseni 6 kuni 8. Aktiivmuda kuivaine sisaldus tuleks kindlaks määrata, nagu eelmises lõigus kirjeldatud.

Kui järjestikustel päevadel (maksimaalselt neli päeva) on vaja kasutada sama muda partiid, lisatakse iga tööpäeva lõpus veel 50 ml kunstlikku reovett ühe liitri muda kohta.

1.6.4. *Katse käik*

Kestus/kokkupuuteaeg:	30 minutit ja/või kolm tundi, kogu aja vältel rakendatakse aereerimist
Vesi:	joogivesi (vajaduse korral deklooritud)
Õhu lisamine:	puhas, õlivaba õhk. Õhuvool 0,5–1 l/minutis
Mõõteaparatuur:	lamedapõhjaline konteiner, näiteks BOD-konteiner
Hapnikumõõtur:	sobiv hapnikuelektrood koos registreerijaga
Toitelahus:	sünteetiline reovesi (vt eestpoolt)
Uuritav aine:	uuritav lahus valmistatakse värskena, vahetult enne testi alustamist
Võrdlusaine:	näiteks 3,5-dikloorfenool (vähemalt kolme erinevat kontsentratsiooni)
Kontrollid:	inokuleeritud proov, mis ei sisalda uuritavat ainet
Temperatuur:	20 ± 2 °C.

Järgnevalt on kirjeldatud soovitatavaid katseprotseduure, mida võib järgida nii uuritava kui ka võrdlusaine puhul kolmetunnise kokkupuuteperioodi vältel.

Kasutatakse mitmeid anumaid (näiteks üheliitrisid mõõteanumaid).

Kasutada tuleks vähemalt viit kontsentratsiooni, mis erineksid mitte rohkem kui 3,2 korda.

Ajahetkel 0 lahustatakse 16 ml kunstliku reovee toitelahust veega kuni 300 ml-ni. Lisatakse 200 ml mikrobiaalset inokulaati ja saadud segu (500 ml) valatakse esimesse anumasse (esimene kontroll C₁).

▼B

Katsenõusid tuleb pidevalt aereerida, et lahustunud O₂ väärtus ei langeks alla 2,5 mg/l ja et vahetult enne hingamissageduse mõõtmist oleks O₂ kontsentratsioon ligikaudu 6,5 mg/l.

Ajahetkel „15 minutit“ (15 minutit on suvaline, kuid usaldusväärne ajavahemik) korratakse eespool kirjeldatud. Erinevuseks on 100 ml uuritavat ainet sisaldava põhilahuse lisamine 16 ml kunstlikku reovette enne vee lisamist (lahjendamiseks 300 ml-ni) ja mikrobiaalsesse inokulaati, et saada lõppkoguseks 500 ml. Saadud segu valatakse teise anumasse ja aereeritakse, nagu eespool kirjeldatud. Seda protsessi korratakse 15minutiliste intervallide järel erinevate uuritavat ainet sisaldava põhilahuse kogustega, et saada anumad uuritava aine erinevate kontsentratsioonidega. Lõpuks valmistatakse teine kontroll (C₂).

Kolme tunni pärast registreeritakse pH, esimese anuma sisust võetud korralikult segatud proov valatakse mõõteaparaati ja respiratsiooni intensiivsust mõõdetakse kuni 10 minuti vältel.

Sama mõõtmist korratakse iga nõu sisuga 15minutiliste intervallide järel, sellisel juhul on iga anuma puhul kokkupuuteaeg kolm tundi.

Võrdlusainet analüüsitakse iga partii bakteriaalse inokulaadiga samal viisil.

Kui mõõtmisi tuleb teha 30 minutit pärast kokkupuudet, vajalik võib olla teistsugune režiim.

Kui on vaja mõõta hapnikutarvet, valmistatakse ette uued anumad, mis sisaldavad uuritavat ainet, kunstlikku reovett ja vett, kuid mitte aktiivmuda. Hapniku tarbimist mõõdetakse ja registreeritakse pärast 30minutilist ja/või kolmetunnist aereerimist (kokkupuuteaeg).

2. ANDMED JA HINDAMINE

Respiratsiooni intensiivsust arvutatakse registreerija näidu vahemikus ligikaudu 6,5 mg O₂/l kuni 2,5 mg O₂/l või 10minutilises perioodis, kui respiratsiooni intensiivsus on väike. Respiratsiooni kõvera osa, mille ajal respiratsiooni intensiivsust mõõdetakse, peab olema lineaarne.

Kui kahe kontrolli respiratsiooni intensiivsuse näitajate omavahelised erinevused ei ole 15 % sees või ei ole võrdlusaine EC₅₀ (30 minutit ja/või kolm tundi) aktsepteeritud vahemikus (5–30 mg/l 3,5-dikloor-fenooli), on katse kehtetu ja seda tuleb korrata.

Iga uuringulahuse kontsentratsiooni kohta arvutatakse protsentuaalne inhibeerumine (vt 1.2). Graafiku teljestikule kantakse protsentuaalne inhibeerumine suhtes kontsentratsiooniga ning saadud EC₅₀ väärtus.

Standardprotseduuride kasutamisel saab EC₅₀ väärtuste kohta määrata 95 % usalduspiirid.

▼B3. **ARUANDLUS**

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgnevat teavet:

- uuritav aine: keemilised omadused;
- uuringu süsteem: päritolu, kontsentratsioon ja võimalikud aktiivmuda eeltöötused;
- katsetingimused:
 - reaktsioonisegu pH enne hingamise mõõtmist;
 - katsetemperatuur;
 - katse kestus;
 - võrdlusaine ja selle mõõdetud EC₅₀;
 - abiootiline hapniku omastamine (kui esineb);
- tulemused:
 - kõik mõõdetud andmed;
 - inhibeerumise kõver ja EC₅₀ arvutusmeetod;
 - EC₅₀ ja võimaluse korral 95 % usalduspiirid, EC₂₀ ja EC₈₀;
 - kõik jälgimised ja võimalikud hälbed, mis võiksid tulemusi mõjutada.

3.2. ANDMETE TÕLGENDAMINE

EC₅₀ väärtust tuleks pidada vaid viiteks võimalikule uuritava aine toksilisusele kas reoveepuhastist saadud aktiivmudas või reovees sisalduvatesse mikroorganismidesse, kuna keskkonnas asetleidvaid keerukaid koosmõjusid ei saa laboritingimustes täpselt jäljendada. Lisaks võivad ka uuritavad ained põhjustada ebatiüpilisi inhibeerumise kõveraid, kuna võivad pärssivalt mõjuda ammoniaagi oksüdatsioonile. Eeltoodust lähtuvalt tuleks selliseid kõveraid tõlgendada ettevaatusega.

4. **VIITED**

- 1) International Standard ISO 8192-1986.
- 2) Broecker, B., Zahn, R., *Water Research* 11, 1977, p. 165.
- 3) Brown, D., Hitz, H. R., Schaefer, L., *Chemosphere* 10, 1981, p. 245.
- 4) ETAD (Ecological and Toxicological Association of Dyestuffs Manufacturing Industries), *Recommended Method No 103*, also described by:
- 5) Robra, B., *Wasser/Abwasser* 117, 1976, p. 80.
- 6) Schefer, W., *Textilveredlung* 6, 1977, p. 247.
- 7) OECD, Paris, 1981, Test *Guideline 209*, Decision of the Council C(81) 30 final.

▼B**C.12. BIODEGRADATSIION****MODIFITSEERITUD SCAS TEST****1. MEETOD****1.1. SISSEJUHATUS**

Meetodi eesmärk on hinnata veeslahustuvate, mittelenduvate orgaaniliste ainete võimalikku lõpp-biodegraderumist kokkupuutel suhteliselt suurte mikroorganismide kontsentratsioonidega pika aja jooksul. Mikroorganismide elusolek säilitatakse selles perioodis, toites aktiivmuda iga päev setitatud reovee lisamisega. (Nädalavahe-tuse vajaduste katmiseks võib reovett säilitada temperatuuril 4 °C. Teise võimalusena võib kasutada OECD kunstlikku reovett.)

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

Seoses vedela faasi pika viibeaaja perioodiga (36 tundi) ja vahepealse toitainete lisamisega ei jäljenda test neid tingimusi, mis tekivad reoveepuhastis. Erinevate uuritavate ainetega saadud tulemused viitavad sellele, et testi biodegradatsioonivõime on suur.

Testis tekitatud tingimused on äärmiselt soodsad uuritavat ühendit degradeerivate mikroorganismide valikuks ja/või adaptatsiooniks. (Protseduuri võib samuti kasutada aklimatiseeritud inokulaadi tekitamiseks, mida kasutada teistes testides.)

Selle meetodi puhul kasutatakse uuritava aine lõpliku biodegradatsiooni hindamiseks lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni määramist. LOS-määramine pärast hapestamist ja puhastamist on eelistatum meetod kui lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioonide erinevuse ($C_{\text{üld}} - C_{\text{anorgaaniline}}$) arvutamine.

Samaaegne spetsiifilise analüüsimeetodi kasutamine võib anda võimaluse aine esmase degradatsiooni hindamiseks (lähteühendi keemilise struktuuri kadumine).

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

- on veeslahustuvad (vähemalt 20 mg lahustunud orgaanilist süsinikku/l);
- omavad tühist küllastatud aururõhu väärtust;
- ei ole bakterite suhtes pärssiva toimega;
- ei adsorbeeru oluliselt testisüsteemi;
- ei kao katselahusest vahu tekke tulemusena.

Määrata tuleb orgaanilise süsiniku sisaldus uuritavas materjalis.

▼B

Uuringutulemuste tõlgendamisel on kasulik teada uuritava materjali põhikomponentide kohta käivat teavet. Seda eelkõige juhtudel, kui tulemused on väga väikesed või alammääralsed.

Informatsioon aine toksilisuse kohta mikroorganismidesse võib olla kasulik väikeste tulemuste interpreteerimisel ja katseks sobiva kontsentratsiooni valimisel.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

C_T = uuritava ühendi kontsentratsioon orgaanilise süsiniku juuresolekul või setitatud reoveele lisamisel aeratsiooniperioodi alguses (mg/l),

C_t = lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon, mis on sedastatud uuringu supernatantvedelikus aeratsiooniperioodi lõpus (mg/l),

C_c = lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon, mis on sedastatud kontrolli supernatantvedelikus aeratsiooniperioodi lõpus (mg/l).

Selle meetodi puhul defineeritakse biodegradatsiooni orgaanilise süsiniku kadumisenä. Biodegradatsiooni saab väljendada järgmiselt.

1. Iga päev lisatud ainekogusest eemaldatud D_{da} protsent:

$$D_{da} = \frac{C_t - (C_t - C_c)}{C_t} \times 100 \quad [1]$$

kus

D_{da} = degradatsioon/päevas lisamine.

2. Tiga päeva alguses olemasolevast ainekogusest eemaldatud D_{ssd} protsent:

$$D_{ssd} = \frac{2C_T + C_{ti} - C_{ci} - 3C_{t(i+1)} + 3C_{c(i+1)}}{2C_T + C_{ti} - C_{ci}} \times 100 \quad [2 (a)]$$

$$\approx \frac{2C_T - 2(C_t - C_c)}{2C_T + (C_t - C_c)} \times 100 \quad [2 (b)]$$

kus

D_{ssd} = degradatsioon/aine päeva alguses;

indeksid i ja $(i+1)$ viitavad mõõtmispäevale.

Valem 2a on soovitatav, kui väljavoolu LOS erineb päevast päeva, mille juures aga valem 2b võib kasutada, kui väljavoolu LOS püsib päevast päeva suhteliselt konstantsena.

▼B

1.3. VÖRDLUSAINED

Osadel juhtudel võib uue aine uurimisel olla kasu võrdlusainete kasutamisest. Siinjuures ei tooda aga ära spetsiifilisi võrdlusaineid.

Andmed ringtestides hinnatud ühendite kohta on äratoodud (vt liide 1) peamiselt nii, et meetodi kalibreerimist võib teha pidevalt ja teistsuguse meetodi kasutamisel on võimalik tulemusi omavahel võrrelda.

1.4. UURINGUMEETODI PÕHIMÕTE

Reoveepuhastist pärit aktiivmuda asetatakse (SCAS) seadmeosasse. Lisatakse uuritav ühend ja seetatud olmereovesi ning segu aereeritakse 23 tundi. Seejärel aereerimine peatatakse, lastakse mudal settida ja vedelik valatakse ära.

Aeratsioonikambrisse jäänud muda segatakse järgmise uuritava ühendi alikvoodi ja reoveega ning tsükli korratakse.

Biodegradatsioon tehakse kindlaks lahustunud orgaanilise süsiniku sisalduse põhjal supernatantvedelikus. Saadud tulemust võrreldakse näitajaga, mis on saadud ainult seetatud reoveest võetud kontrollist.

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

1.5. KVALITEEDIKRITEERIUMID

Selle lahustunud orgaanilise süsiniku eemaldamisel põhineva meetodi korduvteostatavust ei ole veel kinnitatud. (Kui kaalutakse primaarset biodegradatsiooni, saadakse väga täpsed andmed materjalide kohta, mida ulatuslikult degradeeritakse.)

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

1.6. KATSEPROTSEDUURI KIRJELDUS

1.6.1. *Ettevalmistused*

Iga uuritava aine ja kontrolli jaoks ühendatakse piisav arv puhtaid aeratsiooniseadmeid (alternatiivina võib kasutada originaalset 1,5 l SCAS testi seadmeosa) ja õhu sisselaske torusid (joonis 1). Katseadmetesse suunatud suruõhk (puhastatud läbi puuvillase filtri) ei tohiks sisaldada orgaanilist süsinikku ja peaks olema eelnevalt küllastatud veega, et vähendada kadusid auramise tõttu.

Vedelikusegu proov, mis sisaldab 1–4 g suspendeeritud tahkeid osakesi/l saadakse peamiselt olmereovee puhastist pärit aktiivmudast. Iga aeratsiooniseadme kohta vajatakse ligikaudu 150 ml vedelikusegu.

▼B

Uuritava aine põhilahused valmistatakse destilleeritud vees; tavalisel juhul vajalik kontsentratsioon on 400 mg/l, kuna iga aeratsioonitsükli alguses annab orgaaniline süsinik uuritava ühendi kontsentratsiooniks 20 mg/l süsinikku, kui biodegradatsiooni ei teki.

Suuremad kontsentratsioonid on lubatud, kui toksilisus mikroorganismidele seda võimaldab.

Määratakse põhilahuste orgaanilise süsiniku sisaldus.

1.6.2. *Katsetingimused*

Katse tuleks teha temperatuuril 20–25 °C.

Kasutatakse suuri aeroobsete mikroorganismide kontsentratsioone (1–4 g/l suspendeeritud kuivainet) ja efektiivne viibeaja periood on 36 tundi. Süsinikku sisaldavat materjali reovee söötmes oksüdeeritakse ulatuslikult, tavaliselt kaheksa tundi alates iga aeratsioonitsükli algusest. Seejärel muda respireerib endogeenselt ülejäänud aeratsiooniperioodi, mille käigus ainuke olemasolev substraat on uuritav ühend, kui see ei ole juba täielikult metaboliseeritud. Need omadused kombineerituna igapäevase testi reinokuleerimisega (kui keskkonnana kasutatakse olmereovett), tagavad äärmiselt soodsad tingimused nii aklimatsiooniks kui ka ulatuslikuks biodegradatsiooniks.

1.6.3. *Katse käik*

Peamiselt olmereoveest pärit aktiivmudaga puhastist või laboriseadmeist võetakse vedelikusegu proov ja seda hoitakse aeroobsetes tingimustes kuni laboris kasutamiseni. Iga aeratsiooniseade ja samuti kontrollseade täidetakse 150 ml vedelikuseguga (kui kasutatakse SCAS originaaltesti ühikut, tuleb kogus kümnekordistada) ja alustatakse aereerimist. 23 tunni pärast aeratsioon peatatakse ja mudal lastakse settida 45 minutit. Järjekorras avatakse kõik torude kraanid ja 100 ml supernatantvedeliku osad eemaldatakse. Setitunud olmereovee proov võetakse vahetult enne kasutamist ja 100 ml lisatakse igasse aeratsioonihikusse jäänud muda kogusele. Alustatakse uuesti aereerimist. Selles staadiumis enam uuritavat materjali juurde ei lisata ja seadmeosadesse lisatakse toitelahusena üks kord päevas olmereovett kuni saadakse seisemisest läbipaistev supernatandi vedelik. Tavaliselt läheb kuni kaks nädalat, et lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldus supernatantvedelikus läheneks iga aeratsioonitsükli lõpus püsiväärtusele.

Selle perioodi lõpuks üksikud setitunud mudakogused segatakse kokku ja igasse seadmeossa lisatakse 50 ml saadud mudasegu.

Kontrollnummatesse lisatakse 95 ml setitatud reovett ja 5 ml vett ning katseanummatesse lisatakse 95 ml setitatud reovett koos 5 ml sobivat uuritavat ühendit sisaldava põhilahusega (400 mg/l). Aeratsiooni alustatakse uuesti ja jätkatakse 23 tundi. Mudal lastakse seejärel settida 45 minutit, vedelik valatakse pealt ära ja analüüsitakse sellest lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldust.

Eespool kirjeldatud „täida-eemalda” -protseduuri korratakse iga päev kogu katse vältel.

▼B

Enne sadestamist võib olla vajalik anumate seinte puhastamine, et hoida ära tahkete osakeste kuhjumist üle vedelikunivoo. Ristkontaminatsiooni vältimiseks kasutatakse iga seadme jaoks eraldi kaabitsat või harja.

Ideaaljuhul tuleks lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldust supernatantvedelikus määrata iga päev, kuigi lubatud on ka harvemad analüüsid. Enne analüüsimist filtreeritakse vedelikud läbi pestud 0,45 µm membraanfiltrite või tsentrifuugitakse. Membraanifiltrid on sobivad, kui on tagatud, et nad ei lase läbi süsinikku ega absorbeeri ainet filtratsiooni etapis. Tsentrifuugis asuva proovi temperatuur ei tohi ületada 40 °C.

Vähese või mittemääratava biodegradatsiooniga ühenditega tehtava katse pikkus on kindlaks määramata, kuid kogemuse põhjal peaks see üldiselt olema vähemalt 12 nädalat, kuid mitte kauem kui 26 nädalat.

2. ANDMED JA HINDAMINE

Lahustunud orgaanilise süsiniku väärtused katse- ja kontrollanumate supernatantvedelikus kujutatakse graafikul võrdluses ajaga.

Biodegradatsiooni saavutamisel läheneb uuritava aine osas sedastatud tase kontrolli puhul kindlaks tehtud näitajale. Kui kahe taseme vahel leitud erinevus püsib kolme järjestikuse mõõtmise puhul, tehakse veel selline arv edasisi mõõtmisi, et võimaldada andmete statistilist töötlust, ja arvutatakse uuritava ühendi protsentuaalne biodegradatsioon (D_{da} või D_{ssd} , vt 1.2).

3. ARUANDLUS

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peaks võimaluse korral sisaldama järgmist teavet:

— kogu teave, mis puudutab kasutatud reovett, seadmetüüpi, uuritava ainega seotud katsetulemusi, võrdlusainet, kui kasutati, ja põhilahust;

— temperatuur;

— eemaldamiskõver koos kirjeldusega, arvutamismeetod (vt 1.2);

— kuupäev ja koht, kust võeti aktiivmuda ja reovee proovid, adaptatsiooni seisund, kontsentratsioon jne;

— kõikide uuringuprotseduuride muutuste teaduslik põhjendus;

— allkiri ja kuupäev.

▼B

3.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Kuna sellisel meetodil uuritud aine ei ole täielikult biolagundatav, eemaldub LOS ainult biodegradatsiooni tõttu normaalsel juhul järkjärgult päevi ja nädalaid, v.a juhtudel, kui aklimatsioon on toimunud äkki (näidatud äkki kadumisenähtena mõne nädala möödumisel).

Mõnikord võib olulist rolli mängida füüsikalise-keemiline adsorptsioon. See on näidatud juhul, kui esineb täielik või osaline lisatud LOS-eemaldamine alguses. Edasine käik sõltub sellistest faktoritest nagu adsorptsiooni ulatus ja suspendeeritud kuivaine sisaldus väljavoolu vees. Tavaliselt suureneb erinevus LOS-kontsentratsioonide vahel kontrollis ja proovi supernatantvedelikus järkjärgult algselt madalalt tasemelt ja see erinevus jääb seejärel uuele tasemele ülejäänud eksperimendiks, v.a aklimatisatsiooni korral.

Kui biodegradatsiooni (või osalise biodegradatsiooni) ja adsorptsiooni tuleb eristada, on vajalikud täiendavad katsed. Seda saab teha mitmel erineval viisil, kuid kõige usaldusväärsem on supernatantvedeliku või muda kasutamine inokulaadina baasuuringu raames (eelistatult respirometriiline uuring).

Selles uuringus tuleks kõrgeid, adsorptsiooni teel mitteemaldatavaid LOS-tulemusi pidada potentsiaalselt biolagundatavateks. Osaline adsorptsiooni teel mitteemaldamine viitab sellele, et kemikaal allub vähemalt osalisele biodegradatsioonile.

LOS-eemaldamise madalate või null-näitajate põhjuseks võib olla mikroorganismide pärssimine uuritava aine poolt ja selle võib vältida ka muda lõhustamine või kadu, mis tekitab häguse supernatandi. Testi tuleks korrata, kasutades uuritava aine madalamaid kontsentratsioone.

Spetsiifilise analüütilise meetodi või ^{14}C -märgistatud uuritava aine kasutamine võib anda suurema tundlikkuse. ^{14}C testi ühendi kasutamisel $^{14}\text{CO}_2$ sedastamine kinnitab biodegradatsiooni teket.

Kui tulemusi antakse ka primaarse biodegradatsiooni kohta, tuleks võimaluse korral anda selgitus keemilise struktuuri muutustele, mis viib uuritava eellasühendi vastusreaktsiooni kadumisele.

Analüütilise meetodi kinnitus tuleb edastada koos vastusega, mis saadi puhta katsekeskkonna kohta.

4. VIITED

- 1) OECD, Paris, 1981, Test Guideline 302 A, Decision of the Council C(81) 30 final.

▼B

1. liide

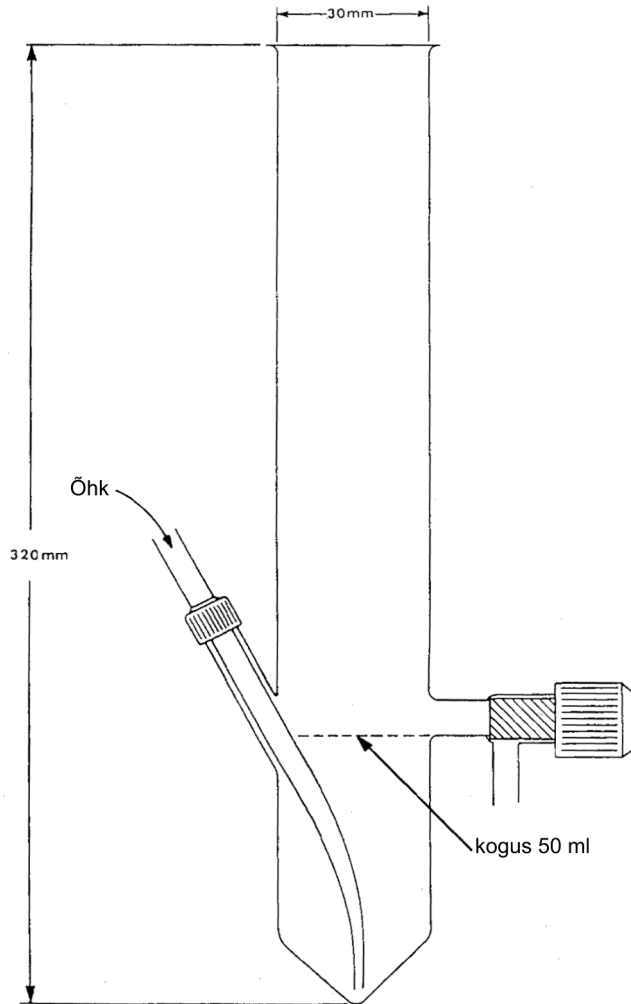
SCAS test: tulemuste näidised

Aine	C_T (mg/l)	$C_T - C_c$ (mg/l)	Protsentuaalne biodegradatsioon D_{da}	Katse kestus (päevades)
4-atsetüülaminobenseensulfonaat	17,2	2,0	85	40
Tetrapropüleenbenseensulfonaat	17,3	8,4	51,4	40
4-nitrofenool	16,9	0,8	95,3	40
Dietüleenglükool	16,5	0,2	98,8	40
Aniliin	16,9	1,7	95,9	40
Tsüklopentaantetrakarboksülaat	17,9	3,2	81,1	120

▼B

2. liide

Uuringuseadme näidis



▼B**C.13. BIODIKONTSESTRATSIOON: KALADEGA LÄBIVOOLUKATSE****1. MEETOD**

Käesolev biokontsentratsiooni meetod on OECD katsejuhendi nr 305 (1996) koopia.

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev meetod kirjeldab ainete biokontsentratsiooni potentsiaali hindamist kalades läbivoolava vee tingimustes. Kuigi kindlalt tuleb eelistada läbivoolutingimustega katseid, on katsetes lubatav kasutada ka poolseisva vee tingimusi eeldusel, et valideerimisõuded on täidetud.

Meetodi kirjeldus on piisavalt üksikasjalik katse tegemiseks, võimaldades samas küllaldast vabadust katse kohandamiseks vastavalt konkreetsetele laboritingimustele ja uuritavate ainete omadustele. Meetod sobib kõige paremini stabiilsete orgaaniliste ainete hindamiseks, mille $\log P_{ow}$ väärtus on 1,5 kuni 6,0 (1), kuid seda saab kasutada ka superlipofiilsete ainete jaoks, mille $\log P_{ow} > 6,0$. Biokontsentratsiooni teguri (BCF) eelhindang, mida tähistatakse ka kui K_B , on selliste superlipofiilsete ainete jaoks eeldatavasti kõrgem kui laborikatsetest saadud püsioleku biokontsentratsiooni tegur (BCF_{SS}). Biokontsentratsiooni teguri eelhindanguid orgaaniliste kemikaalide jaoks, mille $\log P_{ow}$ väärtused on kuni 9,0, saadakse Bintein *et al* (2) võrranditest. Biokontsentratsiooni potentsiaali iseloomustavad parameetrid on seondumise kiiruskonstant (k_1) puhastamise kiiruskonstant (k_2) ja BCF_{SS} .

Radiomärgistatud katseained lihtsustavad vee- ja kalaproovide analüüsimist ning neid võib kasutada otsustamisel, kas on vaja teha laguproduktide identifitseerimist ja kvantitatiivset analüüsi. Kogu radioaktiivse jäägi mõõtmisel (näiteks põletamisel või kudedes lahustamisel) saadud BCF põhineb lähteainel, mis tahes säilinud metaboliitidel ja samuti assimileerunud süsinikul. Seetõttu ei ole kogu radioaktiivse jäägi mõõtmisel põhinev BCF otseselt võrreldav BCFga, mis on saadud ainult lähteaine analüüsil teatud keemiliste meetoditega.

Radiomärgistamisega uuringutes võib lähteainel põhineva BCF määramisel kasutada puhastamismenetlust ja vajaduse korral iseloomustada peamiseid metaboliite. Lisaks on võimalik kombineerida kalade metabolismi uuringut biokontsentratsiooni uuringuga, analüüsidest ja identifitseerides kudedes jääke.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Biokontsentratsioon/bioakumulatsioon on uuritava aine kontsentratsiooni kasv organismis või selle pinnal (teatud kudedes) võrreldes uuritava aine kontsentratsiooniga ümbritsevas keskkonnas.

Biokontsentratsiooni tegur (BCF või K_B) akumulatsioonikatse seondumiskaasi mis tahes ajahetkel on uuritava aine kontsentratsioon kalades (kala pinnal) või teatud kudedes (C_F , ühik $\mu\text{g/g}$ (ppm)) jagatuna uuritava aine kontsentratsiooniga ümbritsevas keskkonnas (C_w , ühik $\mu\text{g/ml}$ (ppm)).

▼B

Püsioleku biokontsentratsiooni tegur (BCF_{SS} või K_B) ei muutu märkimisväärselt pikemaajalise ajavahemiku vältel, kui uuritava aine kontsentratsioon ümbritsevas keskkonnas on selle ajavahemiku vältel konstantne.

Platoo või püsiolek saavutatakse kalades sisalduva uuritava aine kontsentratsiooni (C_f) ja aja funktsiooni esitaval kõveral siis, kui see saab paralleelseks ajateljega ja vähemalt kahepäevaste intervallidega võetud proovide kolm järjestikust C_f analüüsi tulemust on üksteise suhtes $\pm 20\%$ ja kolme proovivõtmisperioodi vahel ei ole märkimisväärsed erinevusi. Ühendatud (puulitud) proovide analüüsimisel on nõutavad vähemalt neli järjestikust analüüsi. Aeglaselt seonduvate ainete jaoks on sobivamaks intervalliks seitse päeva.

Kineetilistest kiiruskonstantidest (k_1/k_2) otse arvatud biokontsentratsiooni tegurit nimetatakse kineetiliseks biokontsentratsiooni teguriks BCF_k .

Jaotuskoeffitsient oktaanol/vesi (P_{ow}) on aine lahustuvuse suhe n-oktaanoolis ja vees tasakaalutingimustel (meetod A.8), seda tähistatakse ka K_{ow} . P_{ow} logaritmi kasutatakse kemikaali biokontsentratsiooni potentsiaali tähistamiseks veeorganismides.

Ekspositsiooni- või seondumisfaas on aeg, mille jooksul kala puutub kokku uuritava ainega.

Seondumise kiiruskonstant (k_1) on numbriline väärtus, mis iseloomustab uuritava aine kontsentratsiooni kasvu kiirust kalas või kala pinnal (või teatud kudedes), kui kala puutub kokku selle ainega (k_1 ühik on päev^{-1}).

Ekspositsioonijärgne või puhastumise (kao) faas on aeg, mis järgneb kala viimisele uuritavat ainet sisaldavast keskkonnast ilma selle aineta keskkonda, mille kestel uuritakse selle aine puhastumist (või summaarset kadu) kalast (või teatud kudedest).

Puhastumise (kao) kiiruskonstant (k_2) on numbriline väärtus, mis iseloomustab uuritava aine kontsentratsiooni vähenemise kiirust kalas (või teatud kudedes) pärast kala viimist uuritavat ainet sisaldavast keskkonnast seda ainet mittesisaldavasse keskkonda (k_2 ühik on päev^{-1}).

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Katse koosneb kahest faasist: ekspositsiooni (seondumise) faas ja ekspositsioonijärgne (puhastumise) faas. Seondumisfaasi ajal viiakse sama liiki kalade erinevad rühmad kokku uuritava aine vähemalt kahe kontsentratsiooniga. Seejärel viiakse kalad puhastumisfaasi jaoks uuritava aine vabasse keskkonda. Puhastumisfaas on alati vajalik, välja arvatud juhul, kui aine seondumine seondumisfaasis oli tähtsusetu (näiteks $BCF < 10$). Uuritava aine kontsentratsiooni kalas või kala pinnal (või teatud kudedes) jälgitakse katse mõlema faasi kestel. Lisaks kahele katses kasutatud kontsentratsioonile hoitakse kontrollrühma kalu samalaadsetes tingimustes ilma uuritava aineta, et võrrelda biokontsentratsiooni katse vältel täheldatud võimalikke ebasoodsaid mõjusid vastava kontrollrühmaga ja teha kindlaks uuritava aine foonilist (mõju mitte avaldavat) kontsentratsiooni.

▼B

Seondumisfaas kestab 28 päeva või vähem, kui on võimalik tõestada, et tasakaal püstitus varem. Seondumisfaasi pikkust ja püsioleku saavutamiseks kuluvat aega saab hinnata 3. liites toodud võrrandi abil. Puhastumisperiood algab kala üleviimisega puhtasse nõusse, milles on sama keskkond, kuid mis ei sisalda uuritavat ainet. Võimaluse korral arvutatakse biokontsentratsiooni tegur nii kalas (C_f) ja vees (C_w) sisalduva uuritava aine kontsentratsiooni suhtena näivas püsiolekus (BCF_{SS}) kui ka kineetilise biokontsentratsiooni tegurina (BCF_k) seondumise kiiruskonstandi (k_1) ja puhastumise kiiruskonstandi (k_2) suhtest eeldades, et protsessid on esimest järku kineetikaga. Kui ilmselgelt ei ole tegemist esimest järku kineetikaga, siis peab kasutama keerulisemaid mudeleid (5. liide).

Kui püsioleku ei saavutata 28 päeva jooksul, siis peab seondumisfaasi pikendama kuni püsioleku saavutamiseni või 60 päeva pikkuseni, sõltuvalt kumb neist esimesena saavutatakse, misjärel alustatakse puhastumisfaasi.

Seondumise kiiruskonstant, puhastumise (kao) kiiruskonstant (või konstandid keerulisemate mudelite korral), biokontsentratsiooni tegur ja kus võimalik, iga nimetatud parameetri usalduspiirid arvutatakse mudelist, mis kirjeldab kõige paremini uuritava aine mõõdetud kontsentratsioone kalades ja vees.

BCF esitatakse kalade märgkaalu funktsioonina. Siiski võib erieesmärgil kasutada teatud kudesid või organeid (näiteks lihased, maks), kui kala on piisavalt suur või kui kala võib jagada söödavaks (filee) ja mittesöödavaks (sisikond) osaks. Kuna paljude orgaaniliste ainete potentsiaalse biokontsentratsiooni ja lipofiil-ipofiilsuse vahel on selge seos, siis on ka uuritava kala rasvasisalduse ja nende ainete vaadeldava biokontsentratsiooni vahel vastav seos. Seetõttu peaks kõrge lipofiilsusega ainete (näiteks $\log P_{ow} > 3$) biokontsentratsiooni väljendama lisaks kogukaalule ka rasvasisalduse suhtes, et vähendada katsetulemuste varieeruvust.

Võimaluse korral peaks rasvasisaldust määrama samast bioloogilisest materjalist, millest määrati uuritava aine kontsentratsioon.

1.4. UURITAVA AINE ANDMED

Enne biokontsentratsiooni katse tegemist peab uuritava aine kohta teadma järgmisi andmeid:

- lahustuvus vees;
- jaotuskoefitsient oktaanol/vesi P_{ow} (tähistatakse ka kui K_{ow} ja määratakse HPLC meetodiga vastavalt punktile A.8);
- hüdrolüüs;
- fototransformatsioon vees, määratakse päikesekiirguse või simuleeritud päikesekiirguse abil biokontsentratsiooni katse kiiritustingimustel (3);

▼B

- pindpinevus (ainete jaoks, mille log P_{ow} väärtust ei saa määrata);
- aururõhk;
- kohene biolagunduvus (vajaduse korral),

Muu nõutav teave on uuritava aine toksilisus katses kasutatava kala-liigi suhtes, eelistatult asümptootiline LC_{50} (st ajast sõltumatu). Teadaoleva mõõtetäpsusega, kordustäpsusega ja tundlikkusega sobilik meetod uuritava aine kvantitatiivse sisalduse määramiseks katselahustes ja bioloogilises materjalis peab olema kättesaadav koos üksikasjaliku kirjeldusega proovi ettevalmistamise ja säilitamise kohta. Samuti peab teadma testainete analüütilist määramispiiri vees ja kala kudedes. ^{14}C -märgistatud uuritava aine kasutamisel on vaja teada ka lisanditest tingitud radioaktiivsuse protsenti.

1.5. KATSE KEHTIVUS

Katse kehtivuseks peavad olema täidetud alljärgnevad tingimused:

- temperatuuride erinevus alla ± 2 °C;
- lahustunud hapniku sisaldus ei tohi langeda alla 60 % küllastuskontsentratsioonist;
- seondumisfaasis hoitakse uuritava aine kontsentratsiooni kambris ± 20 % piires mõõdetud väärtuste keskmisest;
- suremus või muud ebasoodsad mõjud ja haigused kontroll- ja katserühma kaladel on katse lõpus alla 10 %, kui katse kestab mitmeid nädalaid või kuid, siis surm või muud ebasoodsad mõjud peavad mõlemas kalade rühmas olema vähem kui 5 % kuu kohta ja mitte ületama kokku 30 %.

1.6. VÕRDLUSAINED

Vajaduse korral on katsemenetluse kontrollimiseks hea kasutada teadaoleva biokontsentratsiooni potentsiaaliga võrdlusaineid. Siiski ei saa veel soovitada konkreetseid aineid.

1.7. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.7.1. Seadmed

Katseseadme kõikide osade korral peab vältima materjalide kasutamist, mis võivad lahustuda, sorbeeruda või leostuda ning millel on kaladele ebasoodne mõju. Kasutada võib keemiliselt inertsetest materjalidest valmistatud standardseid nelinurkseid või silindrilisi mahuteid, mille mahutavus on kooskõlas voolukiirusega. Vältima peaks pehmest plastmassist torude kasutamist. Eelistatult kasutatakse Teflon®-ist (R), roostevabast terasest ja/või klaasist torustikku. Kogemustest on teada, et vaja võib minna kõrge absorptsioonikoefitsiendiga aineid, nagu sünteetilised püretroidid, silaniseeritud klaas. Sellistel juhtudel peab seadmed pärast kasutamist ära viskama.

▼B1.7.2. *Vesi*

Tavaliselt kasutatakse katses looduslikku vett, mida peaks saama saastumata ja ühtlase kvaliteediga allikast. Lahjendusvesi peab olema sellise kvaliteediga, mis tagab valitud kalaliikide ellujäämise aklimatsiooni- ja katseperioodide vältel, ilma et tekiks mis tahes ebanormaalse välimuse või käitumise ilminguid. Ideaaljuhul peaks saama näidata, et uuritavad liigid jäävad ellu, kasvavad ja paljunevad lahjendusvees (näiteks laborikultuur või elutsükli toksilisuse test). Kasutatavas vees peaks eelnevalt määrama vähemalt pH, üldkareduse, tahke jäägi, kogu orgaanilise süsiniku, eelistatult ka ammoooniumi, nitriti sisalduse ja mereliikide korral ka soolsuse. Kalade optimaalseks kasvuks vajaminevad parameetrid on hästi teada, kuid liites 1 on toodud mitmete parameetrite soovituslikud maksimumkontsentratsioonid mageda ja soolase vee katsetele.

Katseperioodi kestel peaks vesi olema konstantse kvaliteediga. Vee pH väärtus peaks olema vahemikus 6,0 kuni 8,5, kuid konkreetse katse ajal ei tohiks muutus olla suurem kui $\pm 0,5$ pH ühikut. Selleks, et lahjendusvesi ei mõjutaks liialt katsetulemusi (näiteks moodustades uuritava ainega kompleksühendeid) või kalade seisundit, peab teatud ajavahemike järel analüüsima veeproove. Seal kus lahjendusvesi on teadaolevalt suhteliselt püsiva kvaliteediga peaks raskemetallide (näiteks Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), peamiste anioonide ja katioonide (näiteks Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), pestitsiidide (näiteks kõik fosfororgaanilised ja kõik kloororgaanilised pestitsiidid), üldise orgaanilise süsiniku ja suspendeerunud tahkete ainete sisaldust määrama näiteks iga kolme kuu järel. Kui vee kvaliteet on püsiv vähemalt ühe aasta vältel, siis võib erinevaid parameetreid analüüsida harvemini ja proovi võtmise ajavahemikke suurendada (näiteks iga kuue kuu järel).

Lahjendusvee loodusliku hõljuvaine (tahkete osakeste) sisaldus ja üldine orgaaniline süsinik (TOC) peaks olema võimalikult madalad, et vältida uuritava aine adsorptsiooni orgaanilisele hõljuvainele, mis võib vähendada selle biosaadavust (4). Tahkete osakeste maksimumalane vastuvõetav sisaldus on 5 mg/l (kuivaine, mis ei läbi 0,45 µm filtrit) ja üldise orgaanilise süsiniku sisaldus 2 mg/l (vt 1. liidet). Vajaduse korral peaks vett enne kasutamist filtrima. Kalade (väljaheidete) ja toidujääkide panus orgaanilise süsiniku sisaldusele peaks olema võimalikult madal. Kogu katse kestel ei tohiks orgaanilise süsiniku sisaldus katseanumas ületada uuritavast ainest ja lahuseerijast (kui seda kasutatakse pärineva orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni mitte rohkem kui 10 mg/l (± 20 %) võrra.

1.7.3. *Katselahused*

Uuritava aine põhilahus valmistatakse sobiva kontsentratsiooniga. Põhilahus valmistatakse eelistatult uuritava aine segamisel või loksutamisel lahjendusvees. Lahustite või dispergeerijate (solubiliseerijate) kasutamine ei ole soovitatav, siiski võib see olla mõningatel juhtudel vajalik piisavalt kontsentreeritud põhilahuse valmistamisel. Sobivad lahustid on etanool, metanool, etüleenglükoolmonometüüleeter, etüleenglükooldimetüüleeter, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool. Sobivad dispergaatorid on Cremophor RH40, Tween 80, metüülseluloos 0,01 % ja HCO-40. Kergesti biolagunevate ühendite kasutamisega tuleb olla ettevaatlik, kuna need võivad läbivoolu katsetes põhjustada probleeme bakterite kasvuga. Uuritav aine võib olla radiomärgistatud ja ta peaks olema kõrgeima puhtusastmega (näiteks eelistatult > 98 %).

▼B

Läbivoolukatsete jaoks on nõutav süsteem (näiteks mõõtepump, proportsionaalne lahjendaja, küllastamissüsteem), mis jaotab ja lahjendab pidevalt uuritava aine põhilahust katsekambritesse. Katsekambriks peaks vesi eelistatult vahetuma vähemalt viis kambri mahtu ööpäevas. Eelistatud on läbivoolurežiim, kuid kui see pole võimalik (näiteks mõjutab see katseorganisme kahjulikult), võib kasutada poolseisva veega katset eeldusel, et valideerimismõõduid on täidetud. Põhilahuse ja lahjendusvee voolukiiruseid peab kontrollima 48 tundi enne katset ja seejärel vähemalt iga päev katse vältel. Voolukiiruse kontroll peab hõlmama igat katsekambrit ja sellega tagatakse, et voolukiirus ei varieeru rohkem kui 20 % ühe katsekambri piires või katsekambrite vahel.

1.7.4. *Liikide valik*

Liikide valikukriteeriumiteks on kättesaadavus, sobiv suurus ja võimalus kalu laboritingimustes rahuldavalt pidada. Muud kalaliikide valikukriteeriumid hõlmavad harrastuslikku, kaubanduslikku ja ökoloogilist väärtust, aga ka samaväärset tundlikkust, varasemat edukat kasutamist jms.

Soovitavad katseloomade liigid on toodud 2. liites. Kasutada võib ka muid liike, kuid see võib eeldada katsemenetluse kohandamist sobivate katsetingimuste loomiseks. Sellisel juhul tuleb esitada liikide ja katsemeetodi valiku põhjendused.

1.7.5. *Kalade pidamine*

Kalavarude populatsioon peab aklimatiseeruma vähemalt kaks nädalat katse temperatuuril oleva veega ja saama piisavalt sööta, mis on sama tüüpi katses kasutatava söödaga.

Pärast 48tunnist sisseelamisperioodi märgitakse kalade suremus ja rakendatakse järgmisi kriteeriume:

- suremus on suurem kui 10 % populatsioonist seitsme päeva jooksul: terve partii loetakse sobimatuks;
- suremus on 5 % kuni 10 % populatsioonist seitsme päeva jooksul: kalu jälgitakse veel seitse päeva;
- suremus on vähem kui 5 % populatsioonist seitsme päeva jooksul: kalad loetakse sobivaks, kuid kui järgmise seitsme päeva jooksul ületab suremus 5 %, siis loetakse terve partii sobimatuks.

Eelnevalt peab veenduma, et katsetes kasutatavatel kaladel ei ole märgatavaid haigusi ja väärenguid. Kõik haigestunud kalad tuleb jätta kõrvale. Kalu ei tohi ravida kaks nädalat enne katset või katse ajal.

▼B

1.8. KATSE KÄIK

1.8.1. *Eelkatse*

Eelkatse on vajalik selleks, et optimiseerida lõpliku katse tingimusi, näiteks uuritava aine kontsentratsioonid, seondumis- ja puhastumisfaaside kestus.

1.8.2. *Ekspositsioonitingimused*

1.8.2.1. Seondumisfaasi kestus

Seondumisfaasi kestust saab ennustada praktilisele kogemusele tuginedes (näiteks eelnevast uuringust või sarnase kemikaali akumulatsiooni andmetest) või teatud empiiriliste seoste põhjal, milles kasutatakse uuritava aine lahustuvust vees või jaotuskoeffitsienti oktaanool/vesi (vt 3. liidet).

Seondumisfaas kestab 28 päeva või kuni tasakaalu püstitumiseni. Kui püsiolekut ei saavutata 28 päeva jooksul, siis peab seondumisfaasi pikendama ja sooritama lisamõtmisi, kuni püsioleku saavutamiseni või 60 päeva, olenevalt sellest, kumb neist esimesena saavutatakse.

1.8.2.2. Puhastumisfaasi kestus

Ajavahemik, mis võrdub poolega seondumisfaasi kestusest, on tavaliselt piisav aine sobivaks vähenemiseks (näiteks 95 %) kehakaalu kohta (vt 3. liide, hinnangute selgitused). Kui 95 % kao saavutamiseks vajalik ajavahemik on ebapraktiliselt pikk, ületades näiteks kaks korda seondumisfaasi normaalset kestust (st üle 56 päeva), siis võib kasutada lühemat perioodi (st kuni testaine kontsentratsioon on alla 10 % püsioleku kontsentratsioonist). Ainete korral, mille seondumine ja puhastumine on palju keerulisema skeemiga kui esimest järku kineetikaga ühekambriine kaladega mudel, on aine kadumise kiiruskonstantide määramiseks vajalik pikem puhastumisfaas. Nimetatud perioodi pikkus võib olla piiratud ajavahemikuga, mille kestel uuritava aine kontsentratsioon kalas jääb veel ülespoole analüütilisest määramispiirist.

1.8.2.3. Kalade arv

Kalade arv uuritava kontsentratsiooni kohta valitakse nii, et minimaalselt neli kala on proovi kohta iga proovivõtu korra jaoks. Suurema statistilise usaldusväärsuse tagamiseks on vaja proovi kohta suuremat kalade arvu.

Täiskasvanud kalade kasutamisel tuleb üles märkida katses kasutatud kalade sugu. Kui katses kasutatakse mõlemast soost kalu, siis peab enne ekspositsiooni algust dokumentaalselt näitama, et sugudevahelised rasvasisaldused ei erine märkimisväärselt; kusjuures vajalik võib olla kõikide isaste ja emaste kalade puulimine.

▼B

Iga üksiku katse jaoks peab valima sarnase kaaluga kalu, nii et kõige väiksemad kalad moodustaksid vähemalt kaks kolmandikku kõige suuremate kalade kaalust. Kõik kalad peaksid olema ühevanused ja pärinema ühest allikast. Kuna kalade kaal ja vanus mõjutavad mõnikord märkimisväärselt BCF väärtust (1), siis peab sellised üksikasjad täpselt kirja panema. Soovitatavalt võetakse enne katse algust kala-varudest väiksem valim, et hinnata kalade keskmist kaalu.

1.8.2.4. Sisselaskmine

Katse alguses kalade lisamisest põhjustatud C_w vähenemise minimeerimiseks ja lahustunud hapniku kontsentratsiooni alanemise vältimiseks kasutatakse suurt vee ja kalade suhet. Sisselaskmiskiirus peab sobima katses kasutatavatele liikidele. Kõikidel juhtudel soovitatakse normaalselt sisselaskmiskiirust 0,1 kuni 1,0 g kala (märgkaal) liitri vee kohta päevas. Kui uuritava aine nõutavat kontsentratsiooni saab hoida ± 20 % piirides ja lahustunud hapniku kontsentratsioon ei lange alla 60 % küllastumiskontsentratsioonist, siis võib kasutada ka suuremaid kiiruseid.

Sobivate sisselaskmisrežiimide valikul arvestatakse liigi normaalset looduslikku elukohta. Näiteks veekogu põhjas elavad kalad vajavad suuremat akvaariumi põhja pindala sama vee mahu korral võrreldes avamere liikidega.

1.8.2.5. Toitmine

Aklimatsiooni ja katseperioodi vältel toidetakse kalu sobiva toiduga, mille rasva- ja valgusisaldus on teada ning mille kogus on piisav, et hoida neid tervetena ja säilitada kehakaalu. Kalu söödetakse iga päev kogu aklimatsiooniperioodi ja katse vältel sellises koguses, mis on umbkaudu 1–2 % kehakaalust; see hoiab katse ajal enamiku kalaliikide rasvasisalduse suhteliselt püsival tasemel. Toidu kogust peab ümber arvutama näiteks korra nädalas, et säilitada ühtlast kehakaalu ja rasvasisaldust. Selle arvutuse jaoks võib kalade kaalu igas katsekambris hinnata viimati võetud kalaproovi kaalu põhjal. Kambrisse jäävaid kalu ei tohi kaaluda.

Söömata toit ja väljaheidet imetakse sifooniga katsekambrist välja iga päev kohe pärast toitmist (30 minutit kuni tund). Katse ajal hoitakse kambreid nii puhtana kui võimalik, et orgaanilise aine kontsentratsioon oleks võimalikult madal, kuna orgaanilise süsiniku sisaldus võib piirata uuritava aine biosaadavust (1).

Kuna paljud toidusegud valmistatakse kalalihast, siis peab neis eelnevalt analüüsima uuritava aine sisaldust. Lisaks on soovitatav analüüsida toidus pestitsiidide ja raskemetalle.

▼B

1.8.2.6. Valgus ja temperatuur

Valgustusperiood on tavaliselt 12 kuni 16 tundi ja temperatuur (± 2 °C) peaks olema sobilik katses kasutatavatele liikidele (vt 2. liidet). Valgustuse tüüp ja omadused peavad olema teada. Ettevaatlik peab olema uuritava aine võimaliku fototransformatsiooni suhtes katses kasutatavatel valgustustingimustel. Vältimaks kalade kokkupuudet mittelooduspärase valguskiirgusega, peab kasutama sobivat valgustusallikat. Osadel juhtudel võib kasutada filtrit, mis neelab ultraviolettkiirgust lainepikkusega alla 290 nm.

1.8.2.7. Uuritavad kontsentratsioonid

Kalu eksponeeritakse läbivoolu tingimustel vähemalt kahele uuritava aine kontsentratsioonile vees. Tavaliselt valitakse uuritava aine kõrge (või kõrgeim) kontsentratsioon, mis oleks umbes 1 % selle akuutsest asümptootilisest LC₅₀ väärtusest ja see peaks olema vähemalt 10 korda kõrgem kui selle aine määramispiir vees kasutatava analüütilise meetodiga.

Kõrgeima katses kasutatava kontsentratsiooni määramiseks võib akuutse 96 tunni LC₅₀ väärtuse jagada sobiva akuutse ja kroonilise väärtuse suhtega (sobivad suhted võivad mõnede kemikaalide jaoks olla 3 kuni 100). Võimaluse korral tuleb kontsentratsioonid valida nii, et nad erineksid ülaltoodust 100 korda. Kui see ei ole võimalik 1 % LC₅₀ kriteeriumi ja analüütilise määramispiiri tõttu, siis peab kasutama väiksemat kordajat kui 100 või kaaluma ¹⁴C-märgistatud uuritava aine kasutamist. Kasutatav kontsentratsioon ei tohi olla suurem kui uuritava aine lahustuvus.

Solubiliseerija kasutamisel ei tohi selle kontsentratsioon olla suurem kui 0,1 ml/l ja see peab olema ühesugune kõigis katseanumates. Solubiliseerija ja testaine osakaalu üldise orgaanilise süsiniku sisaldusest katses kasutatavas vees peab teadma. Siiski tuleb võimaluse korral vältida selliste ainete kasutamist.

1.8.2.8. Kontrollkatsed

Lisaks katseeriadele tuleb teha üks lahendusvee kontrollkatse või üks kontrollkatse solubiliseerijaga eeldusel, et kasutatav ühend ei mõjuta kalu. Kui ühendi mõju pole kindel, siis peab tegema mõlemad kontrollkatsed.

1.8.3. Vee kvaliteedi mõõtmise sagedus

Katse ajal peaks kõikides kambrites mõõtma lahustunud hapniku, TOC, pH ja temperatuuri väärtusi. Vajaduse korral peaks mõõtma lisaks üldkaredust ja soolsust kontrollkatsetes ja ühes kõrge (või kõrgeima) kontsentratsiooniga kambri. Minimaalselt peaks lahustunud hapnikku ja soolsust mõõtma kolm korda – seonduisperioodi alguses, keskel ja lõpus ning puhastumisperioodi ajal korra nädalas. TOC peaks mõõtma katse alguses (24 tundi ja 48 tundi enne seonduumisaasi algust), enne kalade lisamist ja korra nädalas nii seonduumisaasi kui ka puhastumisfaaside ajal. Temperatuuri peaks mõõtma iga päev, pH-d iga perioodi alguses ja lõpus ning karedust üks kord iga katse ajal. Eelistatult peaks temperatuuri jälgima pidevalt vähemalt ühes katseanumas.

▼B1.8.4. *Kalade ja vee proovide võtmine ning analüüs*

1.8.4.1. Kalade ja vee proovivõtmise ajakava

Katsekambritest võetakse veeproove uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks enne kalade sisselaskmist ning seondumis- ja puhastumisfaaside ajal. Minimaalselt võetakse veeproove samal ajal kalaproovidega ning enne toitmist. Seondumisfaasi ajal määratakse uuritava aine kontsentratsiooni selleks, et kontrollida vastavust valideerimisnõuetele.

Kalaproove võetakse vähemalt viiel korral seondumisfaasi ajal ja vähemalt neljal korral puhastumisfaasi ajal. Kuna osadel juhtudel on keeruline arvutada rahuldava täpsusega BCF väärtuse hinnangut sellise arvu proovide põhjal, eriti kui tegemist ei ole esimest järku puhastumiskineetikaga, siis on soovitatav sagedasem proovivõtmine mõlema perioodi ajal (vt 4. liidet). Lisaproove säilitatakse ja analüüsitakse vaid siis, kui esimese ringi analüüsitulemused ei ole piisavad BCF arvutamiseks soovitud täpsusega.

Vastuvõetava proovivõtu ajakava näide on toodud 4. liites. Muid ajakavasid saab hõlpsasti arvutada, kasutades P_{ow} oletatavaid väärtusi, et arvutada 95 % seondumiseks vajaminevat ekspositsiooniaega.

Proovivõtmist jätkatakse seondumisfaasi ajal kuni püsioleku saavutamiseni või 28 päeva möödumiseni, vastavalt kumb on lühem ajavahemik. Kui püsioleku ei saavutata 28 päeva jooksul, siis peab seondumisfaasi pikendama kuni püsioleku saavutamiseni või 60 päeva möödumiseni, sõltuvalt kumb neist esimesena saavutatakse. Enne puhastumisfaasi viiakse kalad puhastesse mahutitesse.

1.8.4.2. Proovivõtt ja proovi ettevalmistus

Analüüsimiseks imetakse veeproov sifooniga läbi inertse torustiku katsekambri keskosast. Kuna filtrimine või tsentrifugimine ei lahuta alati uuritava aine mitte-bioaadavat fraktsiooni bioaadavast osast (eriti superlipofiilsed kemikaalid, näiteks mille $\log P_{ow} > 5$) (1) (5), siis alati ei tohi neid meetodeid kasutada.

Selle asemel peab kasutama meetmeid mahutite hoidmiseks võimalikult puhtana ja orgaanilise süsiniku sisaldust peaks jälgima nii seondumis- kui ka puhastumisfaaside ajal.

Iga proovivõtuga eemaldatakse katsekambritest sobiv arv kalu (tavaliselt minimaalselt neli). Proovivõtu käigus püütud kalu loputatakse kiiresti veega, kuivatatakse, tapetakse kohe kõige sobivamal ja humaansel viisil ning seejärel kaalutakse.

Eelistatult analüüsitakse kalu ja vett kohe pärast proovivõtmist, et vältida lagunemist või muid kadusid, ja katse jätkudes arvutatakse umbkaudsed seondumis- ja puhastumiskiirused. Kohene analüüs hoiab ära ka viivituse platoo saavutamise kindlaksmääramisel.

▼B

Kui kohene analüüs ei ole võimalik, siis säilitatakse proove sobival meetodil. Enne uuringu algust tehakse kindlaks sobiv meetod uuritava aine säilitamiseks, näiteks sügavkülmutamine, 4 °C juures hoidmine, säilitamise kestus, ekstraktsioon jms.

1.8.4.3. Analüüsimeetodi kvaliteet

Kuna kogu protseduuri täpsuse määrab peamiselt ära uuritava aine määramiseks kasutatava analüüsimeetodi mõõtetäpsus, kordustäpsus ja tundlikkus, siis peab eksperimentaalselt kontrollima, kas keemilise analüüsi täpsus ja korratavus ning uuritava aine eraldamine veest ja kaladest rahuldab selle meetodi tingimusi. Lisaks peab kontrollima, et lahjendusvees ei oleks uuritavat ainet määramispiiri ületavas koguses.

Vajaduse korral parandatakse katsest saadud C_w ja C_f väärtusi kontrollkatsetest saadud saagise ja foonilise kontsentratsiooni väärtustega. Kala ja vee proove käsitletakse nii, et saastumine ja kaod (näiteks adsorptsioon proovivõtuseadmesse) oleks võimalikult väikesed.

1.8.4.4. Kalaproovide analüüs

Kui katses kasutatakse radiomärgistatud aineid, siis on võimalik analüüsida kogu radioaktiivsust (st lähteainete ja metaboliitide) või puhastada proovi nii, et lähteainet saaks eraldi analüüsida. Peamisi metaboliite võib määrata püsiolekus või seondumisfaasi lõpus, sõltuvalt kumb neist saabub varem. Kui BCF on üldiste radiomärgistatud jääkide osas $\geq 1\,000\%$, siis võib olla mõistlik (osade kemikaalide kategooriate, nagu pestitsiidide jaoks tungivalt soovitatav) nende laguproduktide identifitseerimine ja kvantitatiivne analüüs, mis moodustavad püsiolekus $\geq 10\%$ kogu jääkidest kala kudedes. Laguproduktide, mis moodustavad $\geq 10\%$ kõikidest radiomärgistatud jääkidest kala kudedes, identifitseerimisel ja kvantitatiivsel analüüsil on soovitatav identifitseerida ja määrata nende kogus ka katsevees.

Igas kaalutud kalas peab määrama uuritava aine kontsentratsiooni. Kui see ei ole võimalik, siis võib iga proovivõtmise proovid liita (puulida), kuid selline liitmine piirab andmetega tehtavaid statistilisi arvutusi. Kui teatud statistilisi arvutusi ja suurt andmehulka peetakse tähtsaks, siis peab katse kasutama piisaval arvul kalu, et rahuldada soovitud liitmisprotseduuri ja andmehulga nõudeid (6, 7).

BCF esitatakse kogu märgkaalu funktsioonina ja kõrge lipofiilsusega ainete jaoks rasvasisalduse funktsioonina. Kalade rasvasisaldus määratakse võimaluse korral iga proovivõtu käigus. Rasvasisalduse määramiseks kasutatakse sobivaid meetodeid (3. liites viiteid 8 ja 2). Standardmeetodina võib soovitada kloroformi/metanooli ekstraktsioonitehnikat (9). Kuna erinevad meetodid ei anna samaseid tulemusi (10), siis on tähtis viidata kasutatavale meetodile. Võimaluse korral peaks rasvasisaldust analüüsima samas ekstraktis, mida kasutatakse uuritava aine analüüsiks, kuna lipiidid eemaldatakse sageli ekstraktist enne kromatograafilist analüüsi. Kala rasvasisaldus (mg/kg, märgkaal) ei tohiks katse lõpus erineda katse alguse väärtusest mitte rohkem kui $\pm 25\%$. Kudede tahke jäägi sisalduse peab samuti ära märkima, et rasva kontsentratsiooni märgkaalus oleks võimalik ümber arvutada kala kuivkaalu kohta.

▼B2. **ANDMED**

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Uuritava aine seondumiskõver saadakse seondumisfaasi kontsentratsiooni kalas või kala pinnal (või kindlaksmääratud kudedes) ja aja funktsioonina aritmeetilises skaalas. Kui kõver saavutab platoo ehk muutub ligikaudu asümptootiliseks ajateljega, siis arvutatakse püsioleku BCF_{SS} järgmisest valemist:

$$\frac{\text{püsioleku } C_f(\text{keskmise})}{\text{püsioleku } C_w(\text{keskmise})}$$

Kui püsiolekut ei saavutata, siis on võimalik ohtlikkuse hindamiseks arvutada BCF_{SS} piisava täpsusega „püsiolekust“, mis on 80 % tasakaaluolekust ($1,6/k_2$) või 95 % tasakaaluolekust ($3,0/k_2$).

Lisaks saab määrata biokontsentratsiooni teguri (BCF_k) kahe esimest järku kineetiliste konstantide k_1/k_2 suhtena. Puhastumise kiiruskonstant (k_2) määratakse tavaliselt puhastumiskõveralt (st testaine kontsentratsiooni vähenemine kalades aja jooksul). Seondumise kiiruskonstant (k_1) arvutatakse k_2 ja C_f väärtuse järgi, mis leitakse seondumiskõveralt (vt 5. liidet). Eelistatud meetod BCF_k ja kiiruskonstantide k_1 ja k_2 määramiseks on mittelineaarne parameetrite hindamine arvutusprogrammiga (11). k_1 ja k_2 arvutamiseks võib kasutada ka graafilisi meetodeid. Kui puhastumiskõver ei ole ilmselgelt esimest järku, siis peab kasutama keerulisemaid mudeleid (vt 3. liites viiteid) ja biostatistika spetsialistide abi.

2.2. TULEMUSTE TÖLGENDAMINE

Tulemuste tõlgendamisel peab olema ettevaatlik, kui uuritava lahuse mõõdetud kontsentratsioonitasemed on analüüsimeetodi määramispiiri ligidal.

Selgelt määratletud seondumis- ja puhastumiskõverad viitavad hea kvaliteediga biokontsentratsiooni andmetele. Seondumis- ja puhastumiskonstantide varieerumine kahe uuritava kontsentratsiooni vahel ei tohiks ületada 20 %. Täheldatud märkimisväärsed erinevused kahe kontsentratsiooni seondumis- ja puhastumiskiiruste vahel peab üles märkima ja andma võimalikud seletused. Üldiselt läheneb BCF usalduspiir hästi kavandatud uuringutes ± 20 %.

3. **ARUANDLUS**

Katsetulemused peavad sisaldama järgmist teavet.

3.1. UURITAV AINE:

- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;
- keemilised identifitseerimisandmed (sealhulgas vajaduse korral orgaanilise süsiniku sisaldus);
- radiomärgistatud ühendite puhul märgistatud aatomite täpne asukoht ja lisanditega seotud radioaktiivsuse protsent.

▼B

3.2. KATSES KASUTATAVAD LIIGID:

- teaduslik nimetus, liin, allikas, olemasolul eeltötlused, aklimatiseerumine, suuruste vahemik jms.

3.3. KATSETINGIMUSED:

- kasutatav katsemenetlus (läbivoolava või poolseisva veega);
- kasutatava valgustuse tüüp ja omadused ning valgustuse kestus(ed);
- katse ülesehitus (näiteks katsekambrite arv ja suurus, vee vahetumise kiirus, paralleelkatsete arv, kalade arv paralleelkatsetes, uuritud kontsentratsioonide arv, seondumis- ja puhastumisfaaside pikkus, vee ja kala proovide võtmise sagedus);
- põhilahuste valmistamismeetod ja uuendamise sagedus (solubiliseerija kasutamisel peab tooma selle kontsentratsiooni ja mõju orgaanilise süsiniku sisaldusele katsevees);
- nominaalsed uuritud kontsentratsioonid, mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed katsenõudes ning nende saamismeetod;
- lahendusvee allikas, eeltötluse kirjeldus, tõendid selle kohta, et kalad suudavad selles vees elada, ja vee omadused: pH, karedus, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, kloori jääksaldus (kui mõõdeti), üldine orgaaniline süsinik, hõljuvained, katsekeskkonna soolsus (kui on asjakohane) ja muud sooritatud mõõtmised;
- vee kvaliteet katseanumates, pH, karedus, TOC, temperatuur ja lahustunud hapniku kontsentratsioon;
- üksikasjalik informatsioon kalade toitmise kohta (toidu tüüp, allikas, koostis (kui võimalik, siis vähemalt rasva- ja valgusisaldus), toidu kogus ja toitmise sagedus);
- andmed kala ja vee proovide töötlemise kohta, sealhulgas valmistamise üksikasjad, säilitamine, ekstraktsioon ning testaine ja rasvasisalduse (kui mõõdeti) analüütilised protseduurid (ja täpsus).

3.4. TULEMUSED:

- eeluuringute tulemused (kui tehti);
- kontrollkatse ja iga katsekambri kalade suremus ning mis tahes täheldatud ebanormaalne käitumine;
- kalade rasvasisaldus (kui määratakse katses);
- kõverad (sealhulgas mõõdetud andmed), mis näitavad uuritava aine seondumist ja puhastumist kalades, aeg püsioleku saavutamiseks;

▼B

- C_f ja C_w väärtused (kui on asjakohane, siis ka standardhälve ja määramispiirkond) kõikide proovivõtmisaegade jaoks (C_f ühik on $\mu\text{g/g}$ märgkaal (ppm) terve keha või teatud kudede jaoks, nagu rasvad, ja C_w ühik on $\mu\text{g/ml}$ (ppm)), lisaks peab esitama kontrollkatsete C_w väärtused (samuti peab esitama fooni määramise katse andmed);
- püsioleku biokontsentratsiooni tegur (BCF_{SS}) ja/või kineetiline biokontsentratsiooni tegur (BCF_k) ja sobivuse korral seondumise ja puhastumise (kao) kiiruskonstantide 95 % usalduspiirid (kõiki väljendatakse terve kala suhtes ja kui mõõdeti, siis looma või teatud kudede kogu rasvasisaldus), võimaluse korral usalduspiirid ja standardhälve ning uuritava aine iga kontsentratsiooni jaoks kasutatud arvutusmeetod ja andmetöötlus;
- radiomärgistatud ühendite kasutamisel võib vajaduse korral esitada andmed mis tahes määratud metaboliitide akumulatsioonise kohta;
- kõik ebatavaline katse kohta, mis tahes kõrvalekaldumine protseduuridest ja muu asjakohane informatsioon.

Tulemusi stiilis „ei määratud määramispiiri läheduses” peab vältima eelkatse meetodi arendamise ja eksperimentaalse ülesehitusega, kuna selliseid tulemusi ei saa kasutada kiiruskonstandi arvutamisel.

4. **VIITED**

- 1) Connell D.W. (1988). Bioaccumulation behaviour of persistent chemicals with aquatic organisms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 102, pp. 117–156 17-156.
- 2) Bintein S., Devillers J. and Karcher W. (1993). Non-linear dependence of fish/fish bioconcentration on n-octanol/water partition coefficient. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 1, pp. 29-390.
- 3) OECD, Paris (1996).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-R-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 lipid 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

1. liide

Kasutuskõlbliku lahjendusvee keemilised omadused

	Aine	Piirkontsentratsioon
1	Osakesed	5 mg/l
2	Üldine orgaaniline süsinik	2 mg/l
3	Ioniseerumata ammoniaak	1 µg/l
4	Kloori jäägid	10 µg/l
5	Fosfororgaanilised pestitsiidid, üldsisaldus	50 ng/l
6	Kloororgaanilised pestitsiidid ja polükloreeritud bife-nüülid, üldsisaldus	50 ng/l
7	Orgaanilise kloori üldsisaldus	25 ng/l
8	Alumiinium	1 µg/l
9	Arseen	1 µg/l
10	Kroom	1 µg/l
11	Koobalt	1 µg/l
12	Vask	1 µg/l
13	Raud	1 µg/l
14	Plii	1 µg/l
15	Nikkel	1 µg/l
16	Tsink	1 µg/l
17	Kaadmium	100 ng/l
18	Elavhõbe	100 ng/l
19	Hõbe	100 ng/l



2. liide

Katsetamiseks soovitatavad kalaliigid

	Soovitatav liik	Soovitatav katsetemperatuuride vahemik (°C)	Soovitatav katseisendi täispikkus (cm)
1	<i>Danio rerio</i> ⁽¹⁾ (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Hamilton-Buchanan), sebrakala	20–25	3,0± 0,5
2	<i>Pimephales promelas</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Rafinesque), pakspea lepamaim	20–25	5,0± 2,0
3	<i>Cyprinus carpio</i> (<i>Teleostei, Cyprinidae</i>) (Linnaeus), karpkala	20–25	5,0± 3,0
4	<i>Oryzias latipes</i> (<i>Teleostei, Poeciliidae</i>) (Temminck ja Schlegel), riisikala	20–25	4,0± 1,0
5	<i>Poecilia reticulata</i> (<i>Teleostei, Poeciliidae</i>) (Peters), gupi	20–25	3,0± 1,0
6	<i>Lepomis macrochirus</i> (<i>Teleostei, Centrarchidae</i>) (Rafinesque), suur päikeseahven	20–25	5,0± 2,0
7	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (<i>Teleostei, Salmonidae</i>) (Walbaum), vikerforell	13–17	8,0± 4,0
8	<i>Gasterosteus aculeatus</i> (<i>Teleostei, Gasterosteidae</i>) (Linnaeus), harilik ogalik	18–20	3,0± 1,0

⁽¹⁾ Meyer A., Orti G. (1993) Proc. Royal Society of London, Series B., Vol. 252, p. 231.

Erinevates riikides on kasutatud mitmesuguseid suudmeala ja merelisi liike, näiteks:

Kotkaskalalane	<i>Leiostomus xanthurus</i>
Sheepshead minnow	<i>Cyprinodon variegatus</i>
Höbekülg	<i>Menidia beryllina</i>
Punnkõht (kirevahvenlane)	<i>Cymatogaster aggregata</i>
Inglise merikeel	<i>Parophrys vertulus</i>
Sarvikvõldas	<i>Leptocottus armatus</i>
Harilik ogalik	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Meriahven	<i>Dicentrarchus labrax</i>
Harilik viidikas	<i>Alburnus alburnus</i>

Kogumine

Tabelis toodud mageveekalasid on lihtne kasvatada ja/või nad on laialt kättesaadavad aasta läbi, kuna aga mereliste ja suudmealade liikide kättesaadavus on piiratud vastavate riikidega. Neid saab kasvatada ja kultiveerida kalafarmides või laboratooriumis, haiguste ja parasiitide suhtes kontrollitud tingimustel nii, et katseloomad on terved ja teadaolevat päritolu. Need kalad on kättesaadavad paljudes maailma piirkondades.

▼ B

3. liide

Seondumis- ja puhastumisfaaside kestuse hindamine

1. Seondumisfaasi kestuse hindamine

Enne katse tegemist saab k_2 ja seeläbi aega, mis on vajalik püsioleku saavutamiseks, hinnata empiirilise seo k_2 ja jaotuskoeffitsiendi n-oktanool/-vesi (P_{ow}) või k_2 ja vees lahustuvuse (s) vahel.

k_2 (päev⁻¹) võib hinnata näiteks järgmisest empiirilisest seosest (1):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \log_{10}(P_{ow}) + 1,47 \quad (r^2 = 0,95) \quad (\text{võrrand 1})$$

Muude seoste kohta vaata viidet 2.

Kui jaotuskoeffitsient (P_{ow}) ei ole teada, siis võib hinnang põhineda (3) kasutatava aine vesilahustuvusel (s):

$$\log_{10} (P_{ow}) = 0,862 \log_{10}(s) + 0,710 \quad (r^2 = 0,994) \quad (\text{võrrand 2})$$

kus s = lahustuvus (mol/l): ($n = 36$).

Need seosed kehtivad vaid kemikaalidele, mille $\log P_{ow}$ väärtused on vahemikus 2–6,5 (4).

Aega, mis kulub püsioleku mingi protsendi saavutamiseks, võib leida seondumist ja puhastumist kirjeldavast üldisest kineetilise võrrandist (esimest järku kineetika) saadud k_2 -hinnangu rakendamisel:

$$\frac{dC_f}{dt} = k_1 \cdot C_w - k_2 \cdot C_f$$

või kui C_w on konstant:

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w (1 - e^{-k_2 t}) \quad (\text{võrrand 3})$$

Püsioleku saavutamisel ($t \rightarrow \infty$) võib võrrandit 3 taandada (5, 6):

$$C_f = \frac{k_1}{k_2} \cdot C_w \quad \text{või} \quad C_f / C_w = k_1 / k_2 = \text{BCF}$$

Siis läheneb $k_1/k_2 \cdot C_w$ kontsentratsioonini „püsiolekus“ ($C_{f,s}$).

Võrrandit 3 võib esitada järgmiselt:

$$C_f = C_{f,s} (1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{or} \quad \frac{C_f}{C_{f,s}} = 1 - e^{-k_2 t} \quad (\text{võrrand 4})$$

Võrrandi 4 rakendamisel võib püsioleku mingi protsendi saavutamise aega hinnata siis, kui k_2 väärtust on eelnevalt hinnatud võrrandi 1 või 2 põhjal.

▼B

Seondumisfaasi statistiliselt optimaalne kestus statistiliselt vastuvõetavate andmete (BCF_k) saamiseks on selline ajavahemik, mis on vajalik, et uuritava aine kontsentratsiooni logaritmi ja lineaarse aja funktsiooni kujutav kõver saavutab keskpunkti või $1,6/k_2$ või 80 % püsiolekust, kuid mitte rohkem kui $3,0/k_2$ või 95 % püsiolekust (7).

Aeg, mis kulub püsioleku 80 % saavutamiseks (võrrand 4):

$$0,80 = 1 - e^{-k_2 t_{80}} \quad \text{või} \quad t_{80} = \frac{1,6}{k_2} \quad (\text{võrrand 5})$$

Samamoodi on 95 % püsiolekust:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2} \quad (\text{võrrand 6})$$

Näiteks seondumisfaasi (up) kestus testaine jaoks, mille $\log P_{ow} = 4$, oleks (kasutades võrrandeid 1, 5 ja 6):

$$\log_{10} k_2 = -0,414 \cdot (4) + 1,47 \quad k_2 = 0,652 \text{ päeva}^{-1}$$

up (80 %) = $1,6/0,652$, s.o 2,45 päeva (59 tundi)

või up (95 %) = $3,0/0,652$, s.o 4,60 päeva (110 tundi)

Seondumisfaasi (up) kestus testaine jaoks, mille $s = 10^{-5}$ mol/l ($\log(s) = -5,0$), oleks (kasutades võrrandeid 1, 2, 5 ja 6):

$$\log_{10} (P_{ow}) = -0,862 (-5,0) + 0,710 = 5,02$$

$$\log_{10} k_2 = -0,414 (5,02) + 1,47$$

$$k_2 = 0,246 \text{ päeva}^{-1}$$

up (80 %) = $1,6/0,246$, s.o 6,5 päeva (156 tundi)

või up (95 %) = $3,0/0,246$, s.o 12,2 päeva (293 tundi)

Alternatiivselt võib võrrandit:

$$t_{eq} = 6,54 \times 10^{-3} P_{ow} + 55,31 \text{ (tundi)}$$

kasutada efektiivse püsioleku saavutamiseks vajamineva aja arvutamiseks (4).

2. Puhastumisfaasi kestuse hindamine

Aega, mis kulub testaine vähenemiseks kalas mõne protsendi võrra esialgsest kontsentratsioonist, saab hinnata üldvõrrandiga, mis kirjeldab seondumist ja puhastumist (esimest järku kineetika) (1, 8).

Puhastumisfaasi jaoks eeldatakse, et C_w on null. Võrrandit võib taandada:

$$\frac{dC_f}{dt} = -k_2 C_f \quad \text{või} \quad C_f = C_{f,0} \cdot e^{-k_2 t}$$

▼B

kus $C_{f,o}$ on kontsentratsioon puhastumisperioodi alguses. Siis 50 % puhastumine saavutatakse ajaga (t_{50}):

$$\frac{C_f}{C_{f,o}} = \frac{1}{2} = e^{-k_2 t_{50}} \text{ või } t_{50} = \frac{0,693}{k_2}$$

Samamoodi saavutatakse 95 % puhastumine ajaga:

$$t_{95} = \frac{3,0}{k_2}$$

Kui esimese perioodi jaoks kasutatakse 80 % seondumist ($1,6/k_2$) ja 95 % kadu puhastumisfaasis ($3,0/k_2$), siis puhastumisfaas on umbkaudu kaks korda pikem kui seondumisfaas.

Tähtis on märkida, et hinnangud põhinevad eeldusel, et seondumise ja puhastumise skeemid järgivad esimest järku kineetikat. Kui see aga ei vasta ilmselgelt esimest järku kineetikale, siis peab kasutama keerulisemaid mudeleid (näiteks viide 1).

Viited (3. liide)

- 1) Spacie A. and Hamelink J. L. (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. and Chem.* 1, pp. 309–320.
- 2) Kristensen P. (1991). Bioconcentration in fish: comparison of BCFs derived from OECD and ASTM testing methods; influence of particulate matter to the bioavailability of chemicals. Danish Water Quality Institute.
- 3) Chiou C. T. and 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. 243 — 255. SCOPE, 1985, John Wiley & 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. 614–622.
- 8) Könemann H. and Van Leeuwen K. (1980). Toxicokinetics in fish: Accumulation and Elimination of six Chloro-benzenes by Guppies. *Chemosphere*, 9, pp. 3–19.



4. liide

Ainete, mille $\log P_{ow} = 4$, biokontsentratsioonikatsete proovivõtu ajakava teoreetiline näide

Kala proovivõtmise	Proovivõtu ajakava		Veeproovide arv	Kalade arv proovi kohta
	Minimaalne nõutav sagedus (päevades)	Lisa proovivõtmise		
Seondumisfaas	-1 0		2 (*) 2	Lisada 45–80 kala
1.	0,3	0,4	2 (2)	4 (4)
2.	0,6	0,9	2 (2)	4 (4)
3.	1,2	1,7	2 (2)	4 (4)
4.	2,4	3,3	2 (2)	4 (4)
5.	4,7		2	6
Puhastumisfaas				Viiä kalad uuritavast ainet vabasse vette
6.	5,0	5,3		4 (4)
7.	5,9	7,0		4 (4)
8.	9,3	11,2		4 (4)
9.	14,0	17,5		6 (4)

(*) Veeproof võtta pärast seda, kui vesi on vahetunud vähemalt kolme kambri mahu võrra.

Sulgudes esitatud väärtused on lisaproovivõtmise korral võetavate proovide (vesi, kalad) arv.

NB! Katse-eelne k_2 väärtuse hindamise tulemus $\log P_{ow} = 4,0$ jaoks on $0,652 \text{ päeva}^{-1}$. Eksperimendi kogupikkus on $3 \times \text{up} = 3 \times 4,6$ päeva, s.o 14 päeva. Seondumisfaasi (up) hindamise kohta vaata 3. liidet.

▼B

5. liide

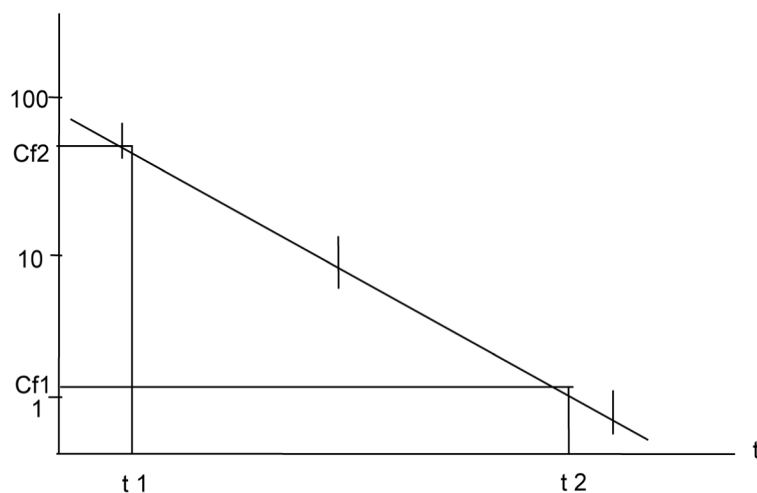
Mudeli valimine

Enamikku biokontsentratsiooni andmeid saab eeldatavalt kirjeldada „piisavalt“ hästi lihtsa kahekambrilise/kaheparameetrilise mudeliga, mida esitab sirgjoon, mis läheneb kalas puhastumisfaasi ajal määratud kontsentratsiooni punktideni, kui need kantakse poollogaritmilisele graafikule. (Kui neid punkte ei saa kanda sirgjoonele, peab kasutama keerulisemaid mudeleid, vt näiteks Spacie ja Hamelink, viide 1 liites 3).

Puhastumise (kao) kiiruskonstandi k_2 graafiline määramismeetod

Igas kalaproovis määratud uuritava aine kontsentratsioon esitatakse aja funktsioonina poollogaritmilisel graafikul. Saadud joone tõus on k_2 .

$$k_2 = \frac{\ln(C_{f1}/C_{f2})}{t_2 - t_1}$$



Peab mainima, et kõrvalekalded sirgjoonest võivad viidata keerulisemale puhastumise skeemile kui esimest järku kineetika. Puhastumise kõrvalekaldumisel esimest järku kineetikast võib kasutada graafilist meetodit, et kindlaks teha selle kõrvalekaldumise tüüpe.

Seondumise kiiruskonstandi k_1 graafiline määramismeetod

Antud k_2 korral arvutatakse k_1 järgmiselt: x

$$k_1 = \frac{C_f k_2}{C_w \times (1 - e^{-k_2 t})} \quad (\text{võrrand 1})$$

C_f väärtus saadakse tasase seondumiskõvera keskpunktist, mis saadi kontsentratsiooni logaritmi ja aja funktsiooni graafilisel kujutamisel (aritmeetilisel skaalal).

▼B**Seondumise ja puhastumise (kao) kiiruskonstantide määramine arvutiprogrammiga**

Eelistatud meetodid biokontsentratsiooni teguri ja kiiruskonstantide k_1 ja k_2 määramiseks on mittelineaarne parameetrite hindamismeetod arvutiprogrammiga. Need programmid leiavad k_1 ja k_2 jaoks väärtusi järjestikuse aja ja kontsentratsiooni andmete ja mudeli põhjal.

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (1 - e^{-k_2 t}) \quad 0 < t < t_c \quad (\text{võrrand 2})$$

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \times (e^{-k_2(t-t_c)} - e^{-k_2 t}) \quad t < t_c \quad (\text{võrrand 3})$$

kus t_c = aeg seondumisfaasi lõpus.

See meetod annab k_1 ja k_2 standardhälvete hinnangu.

Kuna k_2 saab enamikul juhtudel hinnata puhastumiskõveral suhteliselt kõrge täpsusega ja kuna kahe parameetri k_1 ja k_2 vahel on tugev korrelatsioon, siis samaaegsel määramisel on soovitatav esmalt arvutada k_2 puhastumisandmetest ja seejärel arvutada k_1 seondumisandmetest, kasutades mittelineaarset regressiooni.

▼B**C.14. NOORKALADE KASVUKATSE****1. MEETOD**

Käesolev kasvu toksilisuse katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 215 (2000).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesoleva katse eesmärk on hinnata kemikaalidega pikaajalise kokkupuute mõju noorkalade kasvule. See põhineb meetodil, mis töötati välja ja mida on võrreldud laboritevaheliselt (1, 2) Euroopa Liidu piires, et hinnata kemikaalide mõju noorte vikerforellide (*Oncorhynchus mykiss*) kasvule läbivoolutingimustes. Võib kasutada ka teisi hästi dokumenteeritud liike. Näiteks on saadud kogemusi sebrakala (*Danio rerio*) (3, 4) ja jaapani riisikalaga (*Oryzias latipes*) (5, 6, 7) tehtud kasvukatsetest.

Vt ka üldise sissejuhatus C osa.

1.2. MÕISTED

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration, vähim toimet avaldav kontsentratsioon) – madalaim uuritud uuritava aine kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse võrreldes kontrolliga aine märgatavat mõju ($p < 0,05$). Siiski peavad kõik uuritavad kontsentratsioonid, mis on suuremad kui LOEC, omama kahjulikku mõju, mis on võrdne või suurem kui LOEC korral täheldatud mõju.

NOEC (No Observed Effect Concentration – katsealustele organismidele täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon) – uuritav kontsentratsioon, mille väärtus jääb vahetult alla LOEC väärtuse.

EC_x – käesolevas katsemeetodis uuritava aine kontsentratsioon, mis põhjustab x % muutuse kala kasvukiiruses võrreldes kontrollkatsetega.

Laadimisnorm – kalade märgmass vee ruumala kohta.

Loomkoormus – kalade arv vee ruumala kohta.

Üksikute kalade kasvu erikiirus – väljendab ühe üksiku kala kasvukiirust selle esialgse kaalu alusel.

Kasvu keskmistatud erikiirus mahutis – väljendab mahutis oleva populatsiooni keskmist kasvukiirust ühe kontsentratsiooni piires.

Kasvu pseudoerikiirus – väljendab individuaalset kasvukiirust võrrelduna mahutis oleva populatsiooni keskmise esialgse kaaluga.

▼B

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Eksponentsiaalses kasvufaasis olevad noorkalad kaalutakse ja asetatakse katsekambritesse, kus nad eelistatult läbivoolutingimustes või, kui see ei ole võimalik, siis sobivates poolstaatilistes (staatiline – uuendamine) tingimustes puutuvad kokku vees lahustatud uuritava aine paljude subletaalsete kontsentratsioonidega. Katse kestab 28 päeva. Kalu toidetakse iga päev. Toiduratsioon põhineb kalade esialgsel kaalul ja selle võib ümber arvutada pärast 14. päeva. Katse lõppedes kaalutakse kalad uuesti. Mõju kasvukiirusele analüüsitakse regressioonimudeli abil eesmärgiga määrata kindlaks kontsentratsioon, mis põhjustaks kasvukiiruses x % muutuse, st EC_x (nt EC_{10} , EC_{20} või EC_{30}). Alternatiivina võib neid andmeid võrrelda ka kontrollväärtustega, et määrata kindlaks vähim toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) ja seega ka täheldatavat toimet mitte-avaldav kontsentratsioon (NOEC).

1.4. TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

Akuutse toksilisuse katse tulemused (vt katsemeetod C.1), eelistatult samade liikide kohta, kes on valitud kõnealuse katse jaoks, peaksid olema kättesaadavad. See tähendab, et on teada uuritava aine lahustuvus vees ja aururõhk ja olemas on usaldusväärne analüütiline meetod aine kvantifitseerimiseks uuritavates lahustes teadaoleva ja dokumenteeritud täpsusega ja olemas on avastamispiir.

Kasulik teave on sealhulgas struktuurivalem, aine puhtus, püsivus vees ja valguse käes, pK_a , P_{ow} ja kiire biolagunduvuse katse tulemused (vt katsemeetod C.4).

1.5. KATSE VALIIDSUS

Katse valiidsuse kohta kehtivad järgmised tingimused:

- kontroll-looma(de) suremus ei tohi katse lõpus ületada 10 %;
- kalade keskmine kaal kontrollrühma(de)s peab olema piisavalt suurenenud, et võimaldada avastada kasvukiiruse juures oluliseks peetav minimaalne muutus. Laboritevaheline võrdlus (2) on näidanud, et vikerforelli puhul peab kalade keskmine kaal kontrollrühmades suurenema 28 päeva jooksul vähemalt poole võrra (st 50 %) nende esialgsest kaalust; nt esialgne kaal: 1 g/kala (= 100 %), lõplik pärast 28. päeva: $\geq 1,5$ g/kala (≥ 150 %);
- lahustunud hapniku kontsentratsioon peab olema vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadud väärtusest (ASV) kogu katse jooksul;
- vee temperatuur ei tohi mis tahes ajal katse jooksul katsekambrites erineda rohkem kui ± 1 °C ja see tuleks säilitada 2 °C piires katsealusele liigile ettenähtud temperatuurivahemikus (1. liide).

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. Seadmed

Tavalised laboratooriumiseadmed, eeskätt järgmised:

- hapniku- ja pH-mõõturid;

▼B

- seadmed vee kareduse ja leelisuse kindlaksmääramiseks;
- asjakohased temperatuuri reguleerimise ja eelistatavalt pideva monitooringu seadmed;
- keemiliselt inertsest materjalist soovitatud laadimisnormi ja loomkoormuse jaoks piisava suurusega mahutid (vt punkti 1.8.5 ja 1. liidet);
- sobiva täpsusega kaalud (st täpsus kuni $\pm 0,5$ %).

1.6.2. Vesi

Uuringus võib kasutada mis tahes sellist vett, milles katsealune liik kasvab ja milles tal on piisavalt pikk eluiga. Vesi peab olema katseperioodi jooksul püsiva kvaliteediga. Vee pH peaks olema vahemikus 6,5–8,5, siiski ei tohiks see katse jooksul muutuda rohkem kui $\pm 0,5$ pH-ühikut. Soovitatav vee karedus on üle 140 mg/l (väljendatuna CaCO₃-na). Et lahjendamiseks kasutatav vesi ei mõjutaks liigselt katsetulemusi (nt moodustades uuritava aine kompleksi), tuleb vaheaegade järel võtta analüüsimiseks proove. Raskmetallid (nt Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), enamik anioone ja katioone (nt Ca, Mg, Na, K, Cl ja SO₄), pestitsiidid (nt fosfororgaaniliste ja kloororgaaniliste pestitsiidide kogusisaldus), kogu orgaanilise süsiniku ja heljuva tahke aine sisaldus tuleks määrata näiteks iga kolme kuu järel, kui lahjendamiseks kasutatav vesi teatakse olevat suhteliselt püsiva kvaliteediga. Kui vähemalt ühe aasta jooksul on tõestatud püsiv vee kvaliteet, võib neid määramisi teha harvemini ja intervalle pikendada (nt iga kuue kuu järel). 2. liites on esitatud mõned lahjendamiseks kasutatava vee nõuetekohased keemilised omadused.

1.6.3. Uuritavad lahused

Valitud kontsentratsiooniga uuritavad lahused valmistatakse ette põhilahust lahjendades.

Põhilahus tuleks eelistatavalt valmistada lihtsalt uuritava aine segamise või loksutamise lahjendamiseks kasutatavas vees, kasutades selleks mehaanilisi vahendeid (nt segamist või ultraheli). Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne (lahustuvuskolonne).

Lahustite või dispergantide (solubiliseerivate ainete) kasutamine võib sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks olla teatud juhtudel nõutav. Sobivad lahustid on näiteks atsetoon, etanool, metanool, dimetüülsulfoksiid, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool. Sobivad dispergandid on näiteks Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metüülselluloos ja HCO-40. Kergesti biolagunduvate ainete (nt atsetoon) ja/või väga lenduvate ainete kasutamisel tuleb olla ettevaatlik, sest need võivad põhjustada probleeme bakterite kasvu tõttu läbivooluga katsetes. Solubiliseeriva aine kasutamisel ei tohi sellel olla märkimisväärset mõju kalade kasvule ega märgatavat negatiivset mõju noorkaladele, mida saab täheldada ainult lahustiga tehtava kontrollkatse abil.

▼B

Läbivooluga katsete puhul tuleb kasutada süsteemi, mis pidevalt jaotab ja lahjendab uuritava aine põhilahust (nt dosaatorpump, proportsionaallahjendusseade, küllastus seadmega süsteem), et viia katsekambritesse sisse erinevad kontsentratsioonid. Põhilahuste ja lahjendamiseks kasutatava vee voolukiirust tuleb kontrollida katse jooksul kindlate ajavahemike järel, eelistatavalt iga päev, ja need ei tohiks varieeruda rohkem kui 10 % kogu uuringu jooksul. Laboritevaheline võrdlus (2) on näidanud, et vikerforelli puhul on aktsepteeritav vee eemaldumiskiirus katse jooksul 6 liitrit grammi kala kohta päevas (vt punkti 1.8.2.2).

Poolstaatiliste (uuendamiskatsete) puhul sõltub keskkonna uuendamine uuritava aine püsivusest, kuid vett soovitatakse uuendada iga päev. Kui esialgsetes püsivuskatsetes (vt punkti 1.4) ei ole uuritava aine kontsentratsioon uuendamise perioodil stabiilne (st on väljaspool 80–120 % nimiväärtuse ulatust või langeb alla 80 % esialgselt määratud kontsentratsioonist), tuleks kaaluda läbivoolukatse kasutamist.

1.6.4. Liigi valimine

Käesoleva katse puhul soovitatakse kasutada vikerforelli (*Oncorhynchus mykiss*), kuna enamik kogemusi on saadud selle liigi laboritevahelise võrdluse kaudu (1, 2). Siiski võib kasutada ka teisi hästi dokumenteeritud liike, kuid katsemenetlust võib olla tarvis kohandada, et oleks tagatud sobivad katsetingimused. Näiteks on olemas kogemused ka sebrakala (*Danio rerio*) (3, 4) ja jaapani riisikalaga (*Oryzias latipes*) (5, 6, 7). Sellisel juhul tuleb liigi ja katsemeetodi valikut põhjendada.

1.6.5. Kalade pidamine

Katsealused kalad tuleb valida ühest populatsioonist, eelistatavalt samast pesakonnast, mida on hoitud vähemalt kaks nädalat enne katset sellistes veekvaliteedi ja valgustustingimustes, mis sarnanevad katsete kasutatavatele. Kalade päevane toiduratsioon peaks moodustama vähemalt 2 % kehakaalust ja eelistatavalt 4 % kehakaalust päevas kogu pidamisperioodi ja katse jooksul.

Pärast 48tunnise kohanemisperioodi lõppu registreeritakse suremus ja kohaldatakse järgmisi kriteeriume:

- kui suremus on suurem kui 10 % populatsioonist seitsme päeva jooksul: lükatakse kogu partii kõrvale;
- kui suremus on populatsioonist 5–10 %: lastakse kaladel aklimatiseeruda veel seitse päeva; kui nende järgmise seitsme päeva jooksul on suremus suurem kui 5 %, lükatakse kogu partii kõrvale;
- kui suremus on seitsme päeva jooksul väiksem kui 5 % populatsioonist: võetakse partii vastu.

Kalad ei tohiks saada haiguste ravi kaks nädalat enne katset ega katse ajal.

▼B

1.7. KATSE KAVANDAMINE

„Katse kavandamine” on seotud uuritavate kontsentratsioonide arvu ja vahemike, iga kontsentratsioonitaseme jaoks mahutite arvu valiku ja kalade arvu valikuga mahuti kohta. Ideaaljuhul tuleks katse kavandada vastavalt

- uuringu eesmärkidele;
- kasutatava statistilise analüüsi meetodile;
- katsevahendite olemasolule ja maksumusele.

Eesmärkide aruanne peaks võimaluse korral määratlema statistilise võimsuse, millega antud erinevus (nt kasvukiiruses) tuleb tuvastada, või alternatiivina täpsus, millega tuleb määrata EC_x (nt $x = 10, 20$ või 30 ja eelistatavalt mitte alla 10). Ilma selleta ei ole võimalik uuringu suurust kindlalt määratleda.

Tähtis on mõista, et plaan, mis on optimaalne (võimaldab ressursse kõige paremini ära kasutada) ühte statistilise analüüsi meetodit kasutades, ei ole ilmtingimata optimaalne teise jaoks. Seega ei ole soovitatav plaan LOEC/NOEC kindlaksmääramiseks sama, mida soovitakse regressioonanalüüsi korral.

Enamikul juhtudel eelistatakse regressioonanalüüsi dispersioonanalüüsile põhjustel, mida on käsitlenud Stephan ja Rogers (8). Siiski, kui ei ole leitud sobilikku regressioonimudelit ($r^2 < 0,9$), tuleks kasutada NOEC/LOEC.

1.7.1. Regressioonanalüüsi kavandamine

Regressioonanalüüsi kasutava katse kavandamisel tuleb silmas pidada järgmisi tähtsaid asjaolusid:

- toimiv kontsentratsioon (nt $EC_{10, 20, 30}$) ja see kontsentratsioonivahemik, mis pakub uuritava aine toime seisukohalt huvi, peaksid kindlasti olema kaetud katses kasutatavate kontsentratsioonidega. Täpsus, millega saab hinnata toimivaid kontsentratioone, on suurim siis, kui toimiv kontsentratsioon paikneb kasutatud kontsentratsioonivahemiku keskel. Katse esialgse vahemiku leidmiseks võib olla kasulik katses kasutatavate sobivate kontsentratsioonide valimisel;
- selleks, et võimaldada rahuldavat statistilist modelleerimist, peaks katses kasutama vähemalt ühte kontrollmahutit ja viit erinevate kontsentratsioonidega lisamahutit. Solubiliseeriva aine kasutamisel tuleks lisaks katseseeriale kasutada ka ühte kontrollkatset, kus kasutatakse solubiliseerivat ainet kõige suuremas uuritud kontsentratsioonis (vt punkte 1.8.3 ja 1.8.4);
- kasutada võib sobilikku geomeetrilist või logaritmilist jada (9) (vt 3. liidet). Eelistada tuleb uuritavate kontsentratsioonide logaritmilist jaotust;

▼B

- kui kasutatakse rohkem kui kuut mahutit, tuleks lisamahuteid kasutada kas selleks, et võimaldada dubleerimist või jaotada need ära kontsentratsioonivahemike vahel, et võimaldada lähedasem vahemik tasemete vahel. Need mõlemad meetmed on võrdselt soovitatavad.

1.7.2. **Dispersioonanalüüsi (ANOVA) kasutamine NOEC/LOEC määramise kavandamisel**

Eelistatavalt peaksid olema dubleerivad mahutid iga kontsentratsiooni jaoks ja statistiline analüüs tuleks teha mahuti tasandil (10). Ilma dubleerivate mahutiteta ei tohi lubada mahutite vahel mingit varieerivust peale selle, mis on põhjustatud üksikutest kaladest. Siiski, kogemus on näidanud (10), et mahutitevaheline varieerivus oli võrreldes mahutisisesega (st kaladevahelise) varieerivusega uuritud juhtumi korral väga väike. Seetõttu on statistilise analüüsi tegemine üksikute kalade põhjal suhteliselt aktsepteeritavaks alternatiiviks.

Tavapäraselt kasutatakse katses vähemalt viit kontsentratsiooni geomeetrilises jadas, mille tegur eelistatavalt ei ületa 3,2.

Üldiselt, kui katsete tegemisel kasutatakse dubleerivaid mahuteid, peaks dubleerivate kontrollmahutite arv ja seega ka kalade arv olema kaks korda suurem iga uuritava kontsentratsiooni korral olevast arvust (12, 13, 14). Vastupidi, kui dubleerivaid mahuteid ei kasutata, peaks kontrollrühmas olevate kalade arv olema sama, mis iga uuritava kontsentratsiooni korral.

Kui ANOVA analüüs peab põhinema pigem mahutite kui üksikute kalade kohta käivaltel andmetel (mis eeldaks kas iga kala märgistamist või kasvu pseudoerikiiruse kasutamist (vt punkti 2.1.2)), peab dubleerivaid mahuteid olema piisavalt, et oleks võimalik kindlaks määrata sama uuritava kontsentratsiooniga mahutite korral saadud tulemuste standardhälvet. See tähendab, et vigasid puudutav vabadustaseme arv dispersioonanalüüsis peaks olema vähemalt 5 (10). Kui dubleeritakse ainult kontrollkatseid, on oht, et vea varieeruvus moonduks, sest see võib suureneeda koos kõnealuse kasvukiiruse keskväertusega. Kuna kasvukiirus kontsentratsiooni suurenedes tõenäoliselt aeglustub, toob see endaga kaasa varieerivuse liiga suureks hindamise.

1.8. KATSE KÄIK

1.8.1. **Katsealuste kalade valik ja kaalumise**

Tähtis on minimeerida kalade kaalu varieerumine katse alguses. 1. liites esitatakse erinevate liikide sobivad suuruste vahemikud, mida soovitatatakse käesolevas katses kasutada. Katses kasutatava terve kalapartii üksikute kalade kaal katse alguses peaks ideaaljuhul olema vahemikus $\pm 10\%$ aritmeetilisest keskmisest kaalust ja igal juhul ei tohiks see ületada 25%. Soovitatav on varem kaaluda kalade näidispartii, et arvutada välja keskmine kaal.

▼B

Põhipopulatsiooni ei tohiks toita 24 tundi enne katse algust. Seejärel tuleks kalad valida välja juhuslikult. Kasutades üldanestetikumi (nt 100 mg/l trikaiinmetaansulfonaati (MS 222) sisaldavat vesilahust, mis on neutraliseeritud kahe osa naatriumvesinikkarbonaadi lisamisega ühe osa MS 222 kohta), kaalutakse kalad üksikult märjalt (kuivaks pühituna) 1. liites toodud täpsusega. Kalad, kelle kaal on ettenähtud piirides, tuleks katsesse võtta ja jagada ära juhuslikult katseanumate vahel. Kalade kogu märgmass igas katsemahutis tuleks protokollida. Nii anesteetikumide kasutamine kui ka kalade käitlemine (sealhulgas kuivatamine ja kaalumine) võib põhjustada stressi ja vigastusi noorkaladele, eriti väiksema suurusega liikidele. Seetõttu tuleks noorkalu käidelda äärmise ettevaatlikkusega, et vältida katseloomadele stressi tekitamist ja nende vigastamist.

Kalad kaalutakse uuesti katse 28. päeval (vt punkti 1.8.6). Siiski, kui peetakse vajalikuks toiduratsioon ümber arvutada, võib kalu uuesti kaaluda ka katse 14. päeval (vt punkti 1.8.2.3). Kalade suuruse muutuste määramiseks võib kasutada ka teist meetodit, näiteks fotografeerimist, mille põhjal saab kohandada toiduratsioone.

1.8.2. Kokkupuutetingimused**1.8.2.1. Kestus**

Katse kestus on ≥ 28 päeva.

1.8.2.2. Laadimisnormid ja loomkoormused

On oluline, et laadimisnorm ja loomkoormus sobiksid kasutatavale katseliigile (vt 1. liidet). Kui loomkoormus on liiga suur, põhjustab ülekoormus stressi, mis omakorda aeglustab kasvamise kiirust ja võib põhjustada haigestumist. Kui see on liiga väike, võib see põhjustada territoriaalset käitumist, mis omakorda võib mõjutada kasvu. Igal juhul peaks laadimisnorm olema piisavalt väike, et õhustamiseta säilitada lahustunud hapniku kontsentratsioon, mis moodustab vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadavast väärtusest. Laboritevaheline võrdlus (2) on näidanud, et vikerforelli puhul on aktsepteeritav laadimisnorm 16 forelli (kaaluga 3–5 g) 40 liitris. Soovitatav vee eemaldumiskiirus katse jooksul on 6 liitrit grammi kala kohta päevas.

1.8.2.3. Söötmine

Kalu tuleks sööta sobiva toiduga (1. liide) piisaval määral, et esile kutsuda aktsepteeritavat kasvukiirust. Hoolt tuleb kanda mikroobide kasvu vältimise ja vee hägustumise eest. Vikerforelli puhul vastab 4 %ne päevane kaaluüve tõenäoliselt nendele tingimustele (2, 15, 16, 17). Päevase ratsiooni võib jagada kaheks võrdseks portsjoniks ja anda kaladele kaks korda päevas, vähemalt viietunnise vahega. Ratsioon põhineb kalade esialgsel kogukaalul iga katseanuma kohta. Kui kalad kaalutakse uuesti 14. päeval, arvutatakse ratsioon ümber. Kalu ei tohiks toita 24 tundi enne kaalumist.

▼B

Söömata toit ja väljaheited tuleks eemaldada katseanumast iga päev, puhastades hoolikalt iga mahuti põhja imedes.

1.8.2.4. Valgus ja temperatuur

Fotoperiood ja veetemperatuur peaksid olema sobivad katseliigile (1. liide).

1.8.3. Uuritavad kontsentratsioonid

Tavaliselt nõutakse uuritava aine viit kontsentratsiooni hoolimata uuringu kavast (vt punkti 1.7.2). Eelnevad teadmised uuritava aine toksilisuse kohta (nt akuutsest katsest ja/või vahemiku määramise uuringutest) peaks aitama välja valida sobivad uuritavad kontsentratsioonid. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleb seda põhjendada. Kõige kõrgem uuritav kontsentratsioon ei tohiks ületada aine lahustuvuspiiri vees.

Kui põhilahuse valmistamisel kasutatakse solubiliseerivat ainet, ei tohiks selle lõplik kontsentratsioon olla suurem kui 0,1 ml/l ja see peaks eelistatavalt olema sama kõikides katseanumates (vt punkti 1.6.3). Siiski tuleks tarvitusele võtta kõik meetmed, et vältida selliste kemikaalide kasutamist.

1.8.4. Kontrollimised

Lahjendamiseks kasutatava vee kontrollimiste arv sõltub uuringu kavast (vt punkte 1.7–1.7.2). Kui kasutatakse solubiliseerivat ainet, tuleks seda kontrollida sama arv kordi kui vett.

1.8.5. Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus

Katse jooksul määratakse uuritava aine kontsentratsioonid korrapärase ajavahemike tagant (vt allpool).

Läbivoolukatsetes tuleb kontrollida lahusti ja mürkaine põhilahuse voolukiiruseid kindlate ajavahemike järel, eelistatavalt iga päev, ja need ei tohiks varieeruda rohkem kui 10 % kogu katse jooksul. Kui eeldatakse, et uuritava aine kontsentratsioonid on ± 20 % nimiväärtusest (st vahemikus 80–120 %; vt punkte 1.6.2 ja 1.6.3), soovitatakse analüüsida vähemalt kõige kõrgemaid ja madalamaid uuritavaid kontsentratsioone katse alguses ja seejärel nädalaste vaheaegadega. Katse puhul, milles ei eeldata, et uuritava aine kontsentratsioon jääb vahemikku ± 20 % nimiväärtusest (uuritava aine püsivusandmete põhjal), on vajalik analüüsida kõiki uuritavaid kontsentratsioone, kuid järgides sama režiimi.

Poolstaatilistes (uuendamiskatsetes, kus eeldatakse, et uuritava aine kontsentratsioon jääb vahemikku ± 20 % nimiväärtusest, soovitatakse analüüsida vähemalt kõige kõrgemaid ja madalamaid kontsentratsioone kohe pärast valmistamist ja vahetult enne uuendamist uuringu alguses ja seejärel iga nädal. Katsete puhul, milles ei eeldata, et uuritava aine kontsentratsioon jääb vahemikku ± 20 % nimiväärtusest, tuleb analüüsida kõiki uuritavaid kontsentratsioone, järgides sama režiimi, mida kasutatakse püsivamate ainete puhul.

▼B

On soovitatav, et tulemused põhineksid mõõdetud kontsentratsioonidel. Siiski, kui on tõendeid selle kohta, et uuritava aine kontsentratsiooni lahuses on suudetud säilitada rahuldavalt vahemikus $\pm 20\%$ nimiväärtusest või esialgselt mõõdetud kontsentratsioonist kogu katse jooksul, võivad tulemused põhineda nimi- või mõõdetud väärtustel.

Proove võib olla vaja filtreerida (nt kasutades 0,45 μm suuruseid poore) või tsentrifuugimist. Tsentrifuugimine on soovitatav menetlus. Siiski, kui uuritav aine ei adsorbeeru filtritel, on ka filtreerimine aktsepteeritud.

Katse jooksul tuleks mõõta lahustunud hapniku kontsentratsiooni, pH-d ja temperatuuri kõikides katseanumates. Kontrollkatsetes ja suurima kontsentratsiooniga anumates mõõdetakse vee kogukaredust, leelisust ja soolsust (kui see on oluline). Lahustunud hapniku kontsentratsiooni ja soolsust (kui see on oluline) tuleb mõõta minimaalselt kolm korda (katse alguses, keskel ja lõpus). Poolstaatiliste katsete puhul soovitatakse lahustunud hapniku kontsentratsiooni mõõta sagedamini, eelistatavalt enne ja pärast iga vee uuendamist või vähemalt kord nädalas. pH tuleks määrata staatilistes uuendamise katsetes iga vee uuendamise alguses ja lõpus ning vähemalt kord nädalas läbivooluga katsetes. Karedust ja leelisust tuleks mõõta üks kord iga katse ajal. Temperatuuri tuleks eelistatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katseanumas.

1.8.6. Vaatlused

Kaal: katse lõpus tuleb ära kaaluda kõik ellujäänud kalad märgmassi (kuivaks pühituna) saamiseks kas rühmana katseanuma kaupa või üksikult. Üksikute loomade kaalumisele, mis eeldab, et kõik kalad oleksid märgistatud, eelistatakse kaalumist katseanuma kaupa. Individuaalkaalu mõõtmise korral üksikute kalade kasvu erikiiruse kindlaksmääramiseks peaks olema valitud selline märgistamismeetod, mis väldiks loomadele stressi tekitamist (sobida võivad külmmärgistamise alternatiivid, nt peene värvilise õngenööri kasutamine).

Kalad tuleks katseperioodi jooksul üle vaadata iga päev ja mis tahes välised anomaaliad (nagu verejooks, värvimuutus) ja ebanormaalne käitumine kirja panna. Suremus tuleks registreerida ja surnud kalad eemaldada võimalikult kiiresti. Surnud kalu ei asendata, sest laadimisnorm ja loomkoormus on piisavad, et vältida mahutis olevate kalade arvu muutuse mõju kasvule. Siiski tuleb kohandada söödaraatsiooni.

2. ANDMED JA ARUANDLUS**2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Katse kavandamisel ja analüüsimisel soovitatakse kaasata statistikut, kuna käesolev katsemeetod võimaldab märkimisväärset varieerumist eksperimentaalses plaanis, näiteks katsekambrite arvus, uuritavate kontsentratsioonide arvus, kalade arvus jne. Pidades silmas uuringu kavandamises olevaid võimalusi, ei ole siin antud konkreetseid juhi-seid statistiliste menetluste kohta.

▼ B

Kasvukiirusi ei tuleks arvutada välja nende katseandmete kohta, milles suuremus ületab 10 %. Siiski tuleks suuremuse määr registreerida kõikide uuritavate kontsentratsioonide kohta.

Mis meetodit ka ei kasutata andemete analüüsimisel, keskseks kontseptsiooniks on kasvu erikiirus r aegade t_1 ja t_2 vahel. Seda võib väljendada erinevalt, sõltuvalt sellest, kas kõik kalad on märgistatud või mitte, või kas on tarvis keskmist väärtust mahuti kohta.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

kus

r_1 = üksikute kalade kasvu erikiirus

r_2 = keskmine kasvu erikiirus mahutis

r_3 = kasvu pseudoerikiirus

w_1, w_2 = ühe konkreetse kala kaal vastavalt ajahetkedel t_1 ja t_2

$\log_e w_1$ = logaritm üksiku kala kaalust uuringuperioodi alguses

$\log_e w_2$ = logaritm üksiku kala kaalust uuringuperioodi lõpus

$\log_e W_1$ = w_1 väärtuste logaritmid keskmise kalade kohta mahutis uuringuperioodi alguses

$\log_e W_2$ = w_2 väärtuste logaritmid keskmise kalade kohta mahutis uuringuperioodi lõpus

t_1, t_2 = aeg (päevades) uuringuperioodi alguses ja lõpus

r_1, r_2, r_3 võib välja arvutada perioodi 0–28 päeva kohta ja vajaduse korral (st kui on tehtud mõõtmised 14. päeval) ka perioodide 0–14 ja 14–28 päeva kohta.

2.1.1. Regressioonanalüüsi tulemused (kontsentratsioon – vastuse modelleerimine)

Käesolev analüüsimeetod sobib esitama sobivat matemaatilist sõltuvust kasvu erikiiruse ja kontsentratsiooni vahel ja seega võimaldab kindlaks määrata EC_X , st mis tahes nõutava EC väärtuse. Käesoleva meetodi kasutamisel ei ole r arvutamine üksiku kala jaoks (r_1) vajalik ja selle asemel võib analüüs põhineda keskmisel r väärtusel (r_2) mahuti kohta. Eelistatud on viimane meetod. See on samuti sobivam väiksemate liikide kasutamise korral.

Mahuti keskmised spetsiifilised kasvu kiirused (r_2) tuleks j joonestada graafiliselt kontsentratsiooniga suhestatuna, selleks et jälgida kontsentratsiooni-reaktsiooni suhet.

▼B

r_2 ja kontsentratsiooni vahelise sõltuvuse väljendamiseks tuleks valida sobiv mudel ja selle valikut tuleb toetada sobiva põhjendusega.

Kui ellujäänud kalade arv on erinevates mahutites erinev, peab mudeli sobitamisel kasutama kas lihtsaid või mittelinearseid kaalutud mudeleid, mis võimaldavad kasutada erineva suurusega rühmasid.

Mudeli sobitamise meetod peab võimaldama hinnangu andmist näiteks EC_{20} -le ja selle dispersioonile (kas standardviga või usaldusvahemik). Graafik sobitatud mudeli kohta tuleks andmete suhtes esitada nii, et mudeli sobivus oleks ilmne (8, 18, 19, 20).

2.1.2. Tulemuste analüüs LOEC kindlaksmääramiseks

Kui katse sisaldab endas mahutite dubleerimist kõikidel kontsentratsioonitasanditel, peaks LOEC kindlaksmääramine põhinema mahutit iseloomustava keskmise kasvu erikiiruse (vt punkti 2.1) dispersioonanalüüsil (ANOVA), millele järgneb sobiv meetod (nt Dunnetti või Williamsi katse (12, 13, 14, 21) iga kontsentratsiooni keskmise r -väärtuse võrdlemiseks kontrollkatsete keskmise r -väärtusega eesmärgiga kindlaks määrata madalaim kontsentratsioon, mille jaoks see erinevus on oluline 0,05 tõenäosuse tasemel. Kui parameetriliste meetodite eeldatavad nõuded ei ole täidetud –normaaljaotusest erinev jaotus (nt Shapiro-Wilki katse) või heterogeenne dispersioon (Barletti katse) –, tuleks kaaluda andmete teisendamist homogeenseteks dispersioonideks enne ANOVA analüüsi või kaalutud ANOVA tegemist.

Kui katses ei dubleerita mahuteid igal kontsentratsioonitasemel, on mahutitel põhinev ANOVA vähetundlik või ei ole seda võimalik teha. Sellisel juhul oleks vastuvõetavaks kompromissiks võtta ANOVA aluseks üksikute kalade kasvu pseudoerikiirused r_3 .

Iga uuritava kontsentratsiooni r_3 keskvaartust võib seejärel võrrelda kontrollkatsete r_3 keskvaartusega. Seejärel võib kindlaks määrata LOEC nii nagu varem. Tuleb tunnistada, et kõnealune meetod ei võimalda mingil moel võtta arvesse suuremat mahutitevahelist varieeruvust kui see, mis on põhjustatud üksikute kalade vahelisest varieeruvusest, ega taga kaitset selle eest. Siiski on kogemus näidanud (8), et mahutitevaheline varieerivus oli väga väike võrreldes mahutisisesega (st kaladevahelise) varieerivusega. Kui analüüs ei hõlma üksikuid kalu, tuleb esitada võõrväärtuste identifitseerimise meetod ja õigustus selle kasutamiseks.

2.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Tulemuste tõlgendamisel tuleks olla ettevaatlik, kui uuritavates lahustes mõõdetud mürkaine kontsentratsioonid on analüütilise meetodi avastamispiiri lähedal või kui poolstaatilistes katsetes on uuritava aine kontsentratsioon enne uuendamist väiksem kui värskelt valmistatud lahuses.

2.3. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

▼B**2.3.1. Uuritav aine:**

- füüsikaline loomus ning olulised füüsikalise-keemilised omadused;
- keemilised identifitseerimisandmed, sealhulgas puhtus ja uuritava aine kvantifitseerimiseks kasutatav analüütiline meetod (vajaduse korral).

2.3.2. Katsealused liigid:

- võimaluse korral teaduslik nimi;
- liin, suurus, tarnija, mis tahes eelnev ravi jms

2.3.3. Katsetingimused:

- kasutatav katsemenetlus (nt poolstaatiline/uuendav, läbivool, laadimine, loomkoormus jne);
- uuringu kava (nt katseanumate arv, uuritavad kontsentratsioonid ja dubleerivad anumad, kalade arv anuma kohta);
- põhilahuse valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (kui kasutatakse solubiliseerivat ainet, tuleb esitada ka selle kontsentratsioon);
- uuritavate kontsentratsioonide nimiväärtused, uuritavas anumas mõõdetud keskvärtused ja nende standardhälbed ja nende saamismeetod ning tõendid selle kohta, et need mõõtmised vastavad uuritava aine kontsentratsioonidele tegelikus lahuses;
- lahjendamiseks kasutatava vee omadused: pH, karedus, leelisus, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, kloori jääktaimed (kui mõõdetakse), kogu orgaaniline süsinik, suspendeeritud tahked ained, katsekeskkonna soolsus (kui mõõdetakse) ja mis tahes muud tehtud mõõtmised;
- vee kvaliteet katseanumas: pH, karedus, temperatuur ja lahustunud hapniku kontsentratsioon;
- üksikasjalik teave söötmise kohta (nt toidu (toitude) liik, päritolu, antav kogus ja sagedus).

2.3.4. Tulemused:

- tõendid selle kohta, et kontrollkatsete korral kehtis valiidsuskriteerium, ning andmed mis tahes kontsentratsiooni korral esineva suremuse kohta;
- kasutatud statistilise analüüsi meetodid, dubleerimisel või kaladel põhinev statistika, andmete töötlemine ja kasutatud meetodite õigustus;
- andmetabelid üksikute ja keskmiste kalakaalude kohta 0-, 14. (kui mõõdeti) ja 28. päeval, keskmise kasvu erikiiruse kohta mahutis või kasvu pseudoerikiiruse väärtused (vastavalt olukorrale) perioodide 0–28 päeva või võimaluse korral 0–14 ja 14–28 kohta;
- statistilise analüüsi tulemused (st regressioonanalüüs või ANOVA) eelistatavalt tabelite ja graafikute kujul ning LOEC ($p = 0,05$) ja NOEC või EC_x võimaluse korral koos vastavate standardvigadega;

▼B

— kalade ebatavalised reaktsioonid ja nähtavad mõjud, mida on põhjustanud uuritav aine.

3. VIITED

- 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.
- 2) Ashley S., Mallett M. J. and Grandy N. J. (1990). EEC Ring Test of a Method for Determining the Effects of Chemicals on the Growth Rate of Fish. Final Report to the Commission of the European Communities. WRc Report No EEC 2600-M.
- 3) Crossland N. O. (1985). A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth. *Chemosphere*, 14, pp. 1855–1870.
- 4) Nagel R., Bresh H., Caspers N., Hansen P. D., Market M., Munk R., Scholz N. and Höfte B. B. (1991). Effect of 3,4-dichloroaniline on the early life stages of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*): results of a comparative laboratory study. *Ecotox. Environ. Safety*, 21, pp. 157–164.
- 5) Yamamoto, 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, pp. 287–297.
- 7) Benoit, D. A., Holcombe, G. W. and Spehar, R. L. (1991). Guidelines for conducting early life toxicity tests with Japanese medaka (*Oryzias latipes*). Ecological Research Series EPA-600/3-91-063. US Environmental Protection Agency, Duluth, Minnesota.
- 8) Stephan C. E. and Rogers J. W. (1985). Advantages of using regression analysis to calculate results of chronic toxicity tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Eighth Symposium*, ASTM STP 891, R. C. Bahner and D. J. Hansen, eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 328–338.
- 9) Environment Canada (1992). Biological test method: toxicity tests using early life stages of salmonid fish (rainbow trout, coho salmon, or atlantic salmon). Conservation and Protection, Ontario, Report EPS 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, pp. 1096–1121.
- 13) Dunnett C. W. (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, pp. 482-491.

▼B

- 14) Williams D. A. (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. *Biometrics* 27, pp. 103–117.
- 15) Johnston, W. L., Atkinson, J. L., Glanville N. T. (1994). A technique using sequential feedings of different coloured food to determine food intake by individual rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*: effect of feeding level. *Aquaculture* 120, pp. 123-133.
- 16) Quinton, J. C. and Blake, R. W. (1990). The effect of feed cycling and ration level on the compensatory growth response in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Journal of Fish Biology*, 37, pp. 33–41.
- 17) Post, G. (1987). Nutrition and Nutritional Diseases of Fish. Chapter IX in *Testbook of Fish Health*. T.F.H. Publications, Inc. Neptune City, New Jersey, USA. 288 pp.
- 18) Bruce, R. D. and Versteeg D. J. (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. *Environ. Toxicol. Chem.* 11, pp. 1485–1494.
- 19) DeGraeve, G. M., Cooney, J. M., Pollock, T. L., Reichenbach, J. H., Dean, Marcus, M. D. and McIntyre, D. O. (1989). Precision of EPA seven-day fathead minnow larval survival and growth test; intra and interlaboratory study. Report EA-6189 (American Petroleum Institute Publication, No 4468). Electric Power Research Institute, Palo Alto, CA.
- 20) Norbert-King T. J. (1988). An interpolation estimate for chronic toxicity: the IC_p approach. US Environmental Protection Agency. Environmental Research Lab., Duluth, Minnesota. Tech. Rep. No 05-88 of National Effluent Toxicity Assessment Center. Sept. 1988. 12 pp.
- 21) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics* 28, pp. 510–531.

KATSETEKS SOOVITATAVAD KALALIIGID JA SOBIVAD KATSETINGIMUSED

Liik	Soovitav katse-temperatuuri vahemik (°C)	Fotoperiood (tundides)	Soovitav vahemik kala algkaalu jaoks (g)	Nõutav mõõtmis-täpsus	Laadimisnorm (g/l)	Loomkoormus (liitri kohta)	Sööt	Katse kestus (päevades)
Soovitavad liigid: <i>Oncorhynchus mykiss</i> Vikerforell	12,5–16,0	12–16	1–5	lähima 100 mg-ni	1,2–2,0	4	Kaubanduslik lõhelaste kalamaimude kuivtoit	≥ 28
Teised hästi dokumenteeritud liigid: <i>Danio rerio</i> Sebrakala	21–25	12–16	0,050–0,100	lähima 1 mg-ni	0,2–1,0	5–10	Elustoit (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28
<i>Oryzias latipes</i> Jaapani riisikala	21–25	12–16	0,050–0,100	lähima 1 mg-ni	0,2–1,0	5–20	Elustoit (<i>Brachionus Artemia</i>)	≥ 28

▼B

2. liide

**MÕNED AKTSEPTEERITAVA LAHJENDAMISEKS KASUTATAVA
VEE KEEMILISEDOMADUSED**

Aine	Kontsentratsioonid
Tahked ained (mikroosakestena)	< 20 mg/l
Kogu orgaaniline süsinik	< 2 mg/l
Ammoniaak (ioniseerimata)	< 1 µg/l
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide kogusisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja poluklooritud bifenüülidide kogusisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilistes ühendites oleva kloori kogusisaldus	< 25 ng/l



3. liide

Toksilisuse uuringuks sobivate kontsentratsioonide logaritmilised jadad (9)

Veerg (kontsentratsioonide arv 100 ja 10 või 10 ja 1 vahel) (*)						
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

(*) Veerust võib valida viiest (või enamast) järjestikusest kontsentratsioonist koosneva jada. Kontsentratsioonidevahelised keskpunktid veerus (x) leitakse veerus $(2x + 1)$. Loetletud väärtused võivad esindada kontsentratsioone, mida väljendatakse protsendina mahu või massi kohta (mg/l või µg/l). Väärtusi võib vajaduse korral korrutada või jagada 10 mis tahes astmega. 1. veergu võiks kasutada juhul, kui määramatus toksilisuse taseme kohta on suur.

▼B**C.15. KALA EMBRÜO JA REBUKOTIGA VASTSETEGA TEHTAV LÜHIAJALINE TOKSILISUSE KATSE****1. MEETOD**

Käesolev lühiajaline toksilisuse katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 212 (1998).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev lühiajaline toksilisuse katse kalaembrüote ja rebukotiga vastsetega on lühiajaline uuring, milles uuritava ainega kokkupuudet uuritakse alates värskest viljastatud marjaterade arenguetapist kuni rebukotist väljatulekuetapi lõpuni. Embrüote ja rebukotiga vastsete katses ei toimu söötmist ja seega tuleks katse lõpetada ajal, kui rebukotiga vastsed toituvad veel rebukotiist.

Katse eesmärk on kindlaks määrata kemikaalide letaalsed ja teatud ulatuses ka subletaalsed mõjud katses kasutatavate liikide konkreetsetes arenguetappides. Käesolevast katsest saadav teave oleks kasulik, kuna a) selle katse abil oleks võimalik ühendada letaalsed ja subletaalsed uuringud, b) seda võiks kasutada söelkatsena kas täieliku varajaste eluetappide või kroonilise toksilisuse katsete jaoks ja c) sellega võiks uurida liike, mille kasvatamismeetodid ei ole piisavalt arenenud endogeensest toitumisest eksogeensele toitumisele ülemineku perioodi jaoks.

Tuleks pidada meeles, et kemikaalide kroonilist pikaajalist toksilist toimet kaladele saab tavaliselt täpselt hinnata ainult katsete alusel, mis hõlmavad kala kõiki elutsükleid, ja et mis tahes vähendatud ulatuses kokkupuude ainult teatud eluetappidel võib vähendada tundlikkust ja seega võib tuua kaasa kroonilise toksilisuse alahindamise. Seetõttu eeldatakse, et embrüote ja rebukotiga vastsete katse on vähem tundlik kui täiemahuline varajaste eluetappide katse, eriti mis puutub kõrge lipofiilsusega kemikaalidesse ($\log P_{ow} > 4$) ja kemikaalidesse, millel on spetsiifiline toksiline toime. Siiski eeldatakse väiksemaid erinevusi tundlikkuses nende kahe katse vahel selliste kemikaalide puhul, millel on mittespetsiifiline narkootiline toime (1).

Enne käesoleva katse avalikustamist saadi enamik embrüote ja rebukotiga vastsete katse kogemusi magevees elava kalaga *Danio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae* – üldnimetus sebrakala). Üksikasjalikumad juhised katse tegemiseks kõnealuse liigiga on seetõttu esitatud 1. liites. Siiski ei välista see ka teiste liikide kasutamist, mille kohta on olemas kogemusi (tabelid 1A ja 1B).

1.2. MÕISTED

LOEC (Lowest Observed Effect Concentration – vähim toimet avaldav kontsentratsioon) – kõige madalam testitud uuritava aine kontsentratsioon, mille puhul täheldatakse aine märgatavat mõju ($p < 0,05$) võrreldes kontrolliga. Siiski peab kõikidel uuritavatel kontsentratsioonidel, mis on kõrgemad kui LOEC, olema kahjulik mõju, mis on võrdne või suurem kui LOECga täheldatud mõju.

NOEC (No Observed Effect Concentration – täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon) – uuritav kontsentratsioon, mis on vahetult alla LOEC väärtust.

▼B

1.3. KATSE PÕHIMÕTE

Embrüid ja rebukotiga vastsed viiakse kokku vees lahustatud uuritava aine erinevate kontsentratsioonidega. Uuringu võib vastavalt protokollile viia läbi kas poolstaatilisena või läbivoolu-uuringuna. Selle valik sõltub uuritava aine iseloomust. Katse algab viljastatud marjaterade asetamisega katsekambritesse ja lõpetatakse vahetult enne seda, kui mis tahes vastsete rebukott ükskõik millises katsekambri on täielikult imendunud või enne nälgade suremise algust kontrollkatsetes. Letaalset ja subletaalset mõju hinnatakse ja võrreldakse kontrollväärtustega, et kindlaks määrata vähim toimet avaldav kontsentratsioon ja seega ka kontsentratsioon, mille puhul toimet ei täheldata. Alternatiivina võib neid analüüsida regressioonimudeli abil, et kindlaks määrata kontsentratsioon, mis põhjustaks teatud protsentuaalse toime (nt LC/EC_x , kus x on määratletud protsentuaalne toime).

1.4. TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

Akuutse toksilisuse katse tulemused (vt meetodit C.1), eelistatavalt samade liikide kohta, kes on valitud kõnealuse katse jaoks, peaksid olema kättesaadavad. Tulemustest võib olla kasu uuritavate kontsentratsioonide sobiva vahemiku valimisel varajaste eluetappide katse jaoks. Teada peaksid olema uuritava aine lahustuvus vees (sealhulgas lahustuvus katses kasutatavas vees) ning aururõhk. Kättesaadavad peaksid olema usaldusväärne teadaoleva ja dokumenteeritud täpsusega analüütiline meetod uuritava aine kvantifitseerimiseks uuritavates lahustes ning avastamispiir.

Uuritavat ainet puudutav teave, mis on kasulik katsetingimuste loomiseks, on muu hulgas struktuurivalem, aine puhtus, püsivus valguse käes, püsivus katsetingimustes, pK_a , P_{ow} ja kiire biolagunduvuse katse tulemused (vt meetodit C.4).

1.5. KATSE VALIIDSUS

Katse valiidsuse kohta kehtivad järgmised tingimused:

- viljastatud marjaterade üldine ellujäämine kontrollkatsetes ja, kus see on oluline, ka ainult lahustit sisaldavates anumates, peab olema suurem kui 2. ja 3. liites määratletud piirid või nende piiridega võrdne;
- lahustunud hapniku kontsentratsioon peab olema vahemikus 60–100 % õhuga küllastumisel saadud väärtusest (ASV) kogu katse jooksul;
- vee temperatuur ei tohi katsekambrites erineda rohkem kui $\pm 1,5$ °C või järjestikuste päevade lõikes mis tahes ajal katse jooksul ja see tuleks hoida katsealusele liigile ettenähtud temperatuurivahemikus (2. ja 3. liidet).

▼B

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Katsekambrid**

Kasutada võib igasuguseid klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist valmistatud anumaid. Anumate mõõtmed peaksid olema piisavalt suured, et võimaldada vastavust laadimisnormile (vt punkti 1.7.1.2). Katsekambrid soovitatakse paigutada uuringupiirkonnas juhuslikult. Kui laboratooriumis on süstemaatilisi mõjusid, mida on võimalik kontrollida väljajätmise abil, eelistatakse täielikult randomiseeritud süsteemile randomiseeritud plokküsteemi, milles iga menetlus on esindatud igas ploki. Kui kasutatakse väljajätmist, tuleb seda võtta arvesse järgnevas andmete analüüsis. Katsekambrid tuleks varjestada soovimatute häirete eest.

1.6.2. **Kalaliigi valik**

Soovitavad kalaliigid on toodud tabelis 1A. Siiski ei välista see ka teiste liikide kasutamist (näited on toodud tabelis 1B), kuid katsemenetlust võib olla tarvis kohandada sobivate katsetingimuste tagamiseks. Sellisel juhul tuleb liigi ja katsemeetodi valikut põhjendada.

1.6.3. **Sugukalade pidamine**

Sugukalade karja rahuldavatel tingimustel pidamise üksikasjad võib leida OECD juhendist TG 210 ⁽¹⁾ 1 ja viidetes 2, 3, 4, 5, 6).

1.6.4. **Embrüote ja vastsete käitlemine**

Embrüod ja vastsed võivad uuritava ainega puutuda kokku suures anumas olevates võrgust külgedega või otstega väiksemates anumates, mis võimaldavad uuritaval lahusel läbi anuma voolata. Keeristeta voolu läbi nende väikeste anumate võib tekitada nii, et anumad on riputatud kangi külge, mis liigutab neid üles ja alla, kuid hoiab organismid kogu aeg lahuses; kasutada võib ka sifooniga läbivoolutsüsteemi. Lõheliste viljastatud marjaterad võib asetada raamistikule või võrkudele, mille avad on piisavalt suured, et võimaldada vastsetel pärast koorumist seal läbi kukkuda. Poolstaatilistes katsetes, milles kogu vedelik vahetatakse iga päev, võib kasutada Pasteuri pipette embrüote ja vastsete eemaldamiseks (vt punkti 1.6.6).

Kui peamises katseanumas on marjaterade hoidmiseks kasutatud marjaterade konteinereid, reste ja võrke, tuleb need piirangud eemaldada pärast vastsete koorumist, ⁽¹⁾ välja arvatud see, et võrgud tuleks säilitada kalade põgenemise vältimiseks. Kui on vajadus vastsed ümber paigutada, ei tohi nad kokku puutuda õhuga ning võrke ei tohi kasutada kalade vabastamiseks marjaterade konteineritest (mõnede vähem õrnade liikide nagu karpkala puhul ei ole selline ettevaatusabinõu vajalik). Selle ümberpaigutamise ajastamine erineb liigiti ja ümberpaigutamine ei pea alati olema vajalik. Poolstaatilise meetodi korral võib kasutada mõõteklaase või madalaid anumaid ja vajaduse korral võib asetada võrksõela mõõteklaasi põhjast natuke kõrgemale. Kui nende konteinerite ruumala on piisav, et vastata laadimisnõuetele (vt 1.7.1.2), ei ole embrüote või vastsete ümberpaigutamine vajalik.

⁽¹⁾ OECD, Paris, 1992, Test Guideline 210, Fish, Early-life Stage Toxicity Test.

▼B**1.6.5. Vesi**

Katses kasutatavaks veeks sobib vesi, mis vastab 4. liites esitatud aktsepteeritava lahendamiseks kasutatava vee keemilisi omadusi puudutavatele nõuetele ja milles katsealune liik püsib elusana vähemalt sama kaua kui 2. ja 3. liites kirjeldatud vees. See peab olema katseperioodi jooksul püsiva kvaliteediga. pH peab jääma konstantseks vahemikus $\pm 0,5$ pH-ühikut. Selle tagamiseks, et lahendamiseks kasutatav vesi ei mõjutaks liigselt katse tulemusi (näiteks moodustades uuritava ainega kompleksi) ega mõjutaks negatiivselt sugukarja võimet, tuleb vaheaegade järel võtta analüüsimiseks proove. Raskmetallid (nt Cu, Pb, Zn, Hg, Cd ja Ni), enamik anioone ja katioone (nt Ca, Mg, Na, K, Cl ja SO₄), pestitsiidid (nt fosfororgaaniliste ja kloororgaaniliste pestitsiidide kogusisaldus), kogu orgaanilise süsiniku ja heljuva tahke aine sisaldus tuleks määrata näiteks iga kolme kuu järel, kui lahendamiseks kasutatav vesi teatakse olevat suhteliselt püsiva kvaliteediga. Kui vähemalt ühe aasta jooksul on tõestatud püsiv vee kvaliteet, võib neid määramisi teha harvemini ja pikendada intervalle (nt iga kuue kuu järel).

1.6.6. Uuritavad lahused

Valitud kontsentratsiooniga uuritavad lahused valmistatakse ette põhilahust lahjendades.

Põhilahust tuleks eelistatavalt valmistada lihtsalt uuritava aine segamise või loksutamisega lahendamiseks kasutatavas vees, kasutades selleks mehaanilisi vahendeid (nt segamist või ultraheli). Sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks võib kasutada küllastuskolonne (lahustuvuskolonne). Lahustite või dispergantide (solubiliseerivate ainete) kasutamist tuleks vältida nii palju kui võimalik; siiski võib teatud juhtudel neid ühendeid olla tarvis sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks. Sobivad lahustid on näiteks atsetoon, etanool, metanool, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool. Sobivad dispergandid on näiteks Cremophor RH40, Tween 80, 0,01 % metüülselluloos ja HCO-40. Kergesti biolagunduvate ainete (nt atsetoon) ja/või väga lenduvate ainete kasutamisel tuleb olla ettevaatlik, sest need võivad põhjustada probleeme bakterite kasvu tõttu läbivooluga katsetes. Solubiliseeriva aine kasutamisel ei tohi sellel olla märkimisväärset mõju kalade ellujäämisele ega märgatavat negatiivset mõju varajastele eluetappidele, mida saab täheldada ainult lahustiga läbiviidava kontrollkatse abil. Siiski tuleks tarvitusele võtta kõik meetmed, et vältida selliste kemikaalide kasutamist.

Poolstaatilise meetodi korral võib järgida kahte erinevat uuendamise menetlust; kas i) uued uuritavad lahused valmistatakse puhastes anumates ja ellujäänud embrüod ja vastsed paigutatakse ettevaatlikult ümber uutesse anumatesse koos väikese koguse vana lahusega, vältides kokkupuudet õhuga, või ii) katsealused organismid hoitakse anumates, sellal kui osa (vähemalt kolmveerand) katses kasutatavast veest vahetatakse välja. Keskkonna uuendamine sõltub uuritava aine püsivusest, kuid vett soovitatakse uuendada iga päev. Kui esialgsetes püsivuse katsetes (vt punkti 1.4) ei ole uuritava aine kontsentratsioon püsiv (st on väljaspool 80–120 % nimiväärtust või langeb alla 80 % mõõdetud esialgsest kontsentratsioonist) uuendamise perioodil, tuleks kaaluda läbivoolukatse kasutamist. Igal juhul tuleks vältida vastsetele stressi tekitamist vee uuendamise käigus.

▼B

Läbivooluga katsete puhul tuleb kasutada süsteemi, mis pidevalt jaotab ja lahjendab uuritava aine põhilahust (nt dosaatorpump, proportsionaallahjendusseade, küllastus seadmega süsteem), et viia katsekambritesse sisse erinevad kontsentratsioonid. Põhilahuste ja lahjendamiseks kasutatava vee voolukiirust tuleb kontrollida katse jooksul kindlate ajavahemike järel, eelistatavalt iga päev ja need ei tohiks varieeruda rohkem kui 10 % kogu uuringu jooksul. Sobivaks peetakse voolukiirust, mis vastab vähemalt katsekambri viiekordsele ruumalale 24 tunni jooksul (2).

1.7. KATSE KÄIK

Kasulik teave kalaembrüote ja rebukotiga vastsetega tehtud toksilisuse katsete kohta on kättesaadav kirjandusest, millest mõned näited on esitatud käesoleva teksti kirjanduse jaos (7, 8, 9).

1.7.1. **Kokkupuutetingimused**1.7.1.1. *Kestus*

Katse peaks algama eelistatavalt 30 minuti jooksul pärast marjaterade viljastamist. Embrüod viiakse uuritavasse lahusesse enne või võimalikult kohe pärast looteketta jagunemise faasi algust ja kindlasti enne gastrulafaasi algust. Nende embrüote puhul, mis saadakse kaubandusliku tarnija käest, ei pruugi olla võimalik alustada katset kohe pärast viljastamist. Kuna katse tundlikkust võib uuringu alguse edasilükkamine tõsiselt mõjutada, tuleks uuringut alustada kaheksa tunni jooksul pärast viljastamist. Kuna vastseid ei söödeta kokkupuuteperioodi kestel, tuleks katse lõpetada vahetult enne seda, kui mis tahes vastsete rebukott ükskõik millises katsekambri on täielikult imendunud, või enne nälga suremise algust kontrollikatsetes. Kestus sõltub kasutatavast liigist. Mõned soovitatavad kestused on toodud 2. ja 3. liites.

1.7.1.2. *Laadimine*

Viljastatud marjaterade arv katse alguses peaks olema piisav, et vastata statistilistele nõuetele. Marjaterad tuleks jagada juhuvaliku alusel põhimõttel erinevate käitlusrühmade vahel ja ühe kontsentratsiooni kohta tuleks kasutada vähemalt 30 viljastatud marjatera, võrdsest jagatuna (või võimalikult võrdsest, kuna teatud liikide korral on raske saada võrdseid partiisid) vähemalt kolme dubleeriva katsekambri vahel. Laadimismäär (biomass uuritava lahuse ruumala kohta) peaks olema piisavalt väike, et õhustamiseta säilitada lahustunud hapniku kontsentratsioon, mis moodustab vähemalt 60 % õhuga küllastamisest saadavast väärtusest. Läbivooluga katsetes soovitatakse laadimismääri, mis ei ületa 0,5 g/l 24 tunni kohta ega 5 g/l lahust mis tahes ajal (2).

1.7.1.3. *Valgus ja temperatuur*

Fotoperiood ja katses kasutatava vee temperatuur peaksid olema sobivad katseliigile (2. ja 3. liide). Temperatuuri monitooringuks võib olla vajalik kasutada täiendavat katseanumat.

▼B**1.7.2. Uuritavad kontsentratsioonid**

Tavaliselt vajatakse uuritava aine viit kontsentratsiooni, mis erinevad konstantse kordaja võrra, mis ei ole suurem kui 3,2. Uuritavate kontsentratsioonide vahemiku valikul tuleks arvesse võtta LC₅₀ ja kokkupuuteperioodi vahelist sõltuvust akuutsuse uuringu käigus. Teatud juhtudel võib olla sobiv kasutada vähem kui viit kontsentratsiooni, näiteks piirsalduskatsete korral, või kasutada kitsamat kontsentratsioonivahemikku. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleb seda põhjendada. Aine kontsentratsioonid, mis on suuremad kui 96 tunnile vastav LC₅₀ või 100 mg/l, ükskõik kumb neist on madalam, ei ole tarvis uurida. Aineid ei peaks uuringus kasutama kogustes, mis ületavad nende lahustuvuspiiri katses kasutatavas vees.

Kui uuritava lahuse valmistamisel kasutatakse solubiliseerivat ainet (vt punkti 1.6.6), ei tohiks selle lõplik kontsentratsioon katseanumas olla suurem kui 0,1 ml/l ja see peaks olema sama kõikides katseanumates.

1.7.3. Kontrollimised

Lisaks katseeriale tuleks kasutada ka ühte lahuse vee kontrollkatset (vajaduse korral dubleerituna) ning vajaduse korral ka ühte kontrollkatset, kus kasutatakse solubiliseerivat ainet (vajaduse korral dubleerituna).

1.7.4. Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus

Katse jooksul määratakse uuritava aine kontsentratsioonid korrapärase ajavahemike tagant.

Poolstaatilistes katsetes, kus eeldatakse, et uuritava aine kontsentratsioon säilib vahemikus ± 20 % nimiväärtusest (st vahemikus 80–120 %; vt punkte 1.4 ja 1.6.6), soovitatakse analüüsida vähemalt kõige suuremaid ja madalamaid uuritavaid kontsentratsioone, nii värskest valmistatuna kui ka vahetult enne uuendamist vähemalt kolmel korral võrdsete vahedega katse jooksul (st analüüsida tuleks teha samast lahusest saadud proovi põhjal – kui see on värskest valmistatud ja uuendamisel).

Katsete puhul, milles ei eeldata, et uuritava aine kontsentratsioon jääb vahemikku ± 20 % nimiväärtusest (uuritava aine püsivusandmete põhjal), on vajalik analüüsida kõik uuritavad kontsentratsioonid nii värskest valmistatuna kui ka uuendamisel, kuid järgides sama režiimi (st vähemalt kolmel korral võrdsete vahedega katse jooksul). Uuritava aine kontsentratsiooni määramine enne uuendamist tuleks teha ainult ühes dubleerivas anumast iga uuritava kontsentratsiooni korral. Määramiste vahe võib olla kõige rohkem seitse ööpäeva. On soovitatav, et tulemused põhineksid mõõdetud kontsentratsioonidel. Siiski, kui on tõendeid selle kohta, et uuritava aine kontsentratsiooni lahuses on suudetud säilitada rahuldavalt vahemikus ± 20 % nimiväärtusest või esialgsest mõõdetud kontsentratsioonist kogu katse jooksul, võivad tulemused põhineda nimi- või mõõdetud algväärtustel.

Läbivooluga katsete puhul sobib kasutada samasugust proovivõtorežiimi, mida kirjeldati poolstaatiliste katsete puhul (kuid sellisel juhul ei mõõdetata „vanu“ lahuseid). Siiski, kui katse kestus ületab seitset päeva, võib olla soovitatav suurendada nädalasi proovivõtmise kordasid (nt kolm mõõtmisseeriat), et kindlustada uuritavate kontsentratsioonide püsivus.

▼B

Proovid võivad eeldada tsentrifuugimist või filtreerimist (nt kasutades poore suurusega 0,45 µm). Siiski, kuna tsentrifuugimine ega filtreerimine ei tundu alati eraldavat uuritava aine biosaadavat osa mittebiosaadavast, ei tule proovidele ilmtingimata neid toiminguid teha.

Katse jooksul tuleks mõõta lahustunud hapniku kontsentratsiooni, pH-d ja temperatuuri kõikides katseanumates. Kontrollkatsetes ja kõige suuremat kontsentratsiooni sisaldavas anumast mõõdetakse vee kogukaredus ja soolsus (kui see on oluline). Lahustunud hapniku kontsentratsiooni ja soolsust (kui see on oluline) tuleb mõõta minimaalselt kolm korda (katse alguses, keskel ja lõpus). Poolstaatiliste katsete puhul soovitatakse lahustunud hapniku kontsentratsiooni mõõta sagedamini, eelistatavalt enne ja pärast iga vee uuendamist või vähemalt kord nädalas. pH tuleks määrata poolstaatilistes uuendamiskatsetes iga vee uuendamise alguses ja lõpus ning vähemalt kord nädalas läbivooluga katsetes. Karedust tuleks mõõta üks kord iga katse vältel. Temperatuuri tuleks mõõta kord ööpäevas ja seda tuleks eelistatavalt jälgida pidevalt vähemalt ühes katseanumas.

1.7.5. Vaatlused

1.7.5.1. *Embrüonaalse arengu staadium*

Embrüonaalne staadium (st gastrulafaas) uuritava ainega kokkupuute alguses tuleks võimalikult täpselt tõendada. Seda võib teha, kasutades sobivalt säilitatud ja puhastatud esinduslikku marjaterade proovi. Embrüonaalse staadiumi kirjeldamiseks ja illustreerimiseks võib tutvuda ka kirjandusega (2, 5, 10, 11).

1.7.5.2. *Koorumine ja ellujäämine*

Koorumise ja ellujäämise vaatlust tuleks teha vähemalt kord päevas ja vastavad arvud tuleks protokollida. Katse alguses võib olla soovitatav teha sagedasemaid vaatlusi (nt esimese kolme tunni jooksul iga 30 minuti järel), kuna teatud juhtudel võib eluspüsimise aeg olla olulisem kui ainult surnajuhtude arv (nt kui on tegemist akuutse toksilisuse mõjuga). Surnud embrüod ja vastsed tuleks eemaldada kohe, kui neid märgatakse, kuna need võivad kiiresti laguneda. Eriti hoolikas tuleks olla surnud isendite eemaldamisel, et mitte häirida või füüsiliselt kahjustada kõrvalolevaid marjaterasid/vastseid, kuna need on äärmiselt õrnad ja tundlikud. Kriteeriumid surma kohta varieeruvad vastavalt eluetapile:

- **marjaterade puhul:** eriti varastes etappides, märkimisväärne läbipaistvuse kadumine ja värvuse muutus, mis on põhjustatud valkainete koagulatsioonist ja/või sadestamisest, millele järgneb valge läbipaistmatu välimus;
- **embrüote puhul:** kehaliigutuste puudumine ja/või südamelõkete puudumine ja/või värvuse muutumine läbipaistmatuks sellisel liigil, mille embrüod on normaalselt läbipaistvad;
- **vastsete puhul:** liikumatus ja/või hingamise puudumine ja/või südamelõkete puudumine ja/või kesknärvisüsteemi värvumine valgeks ja läbipaistmatuks ja/või reaktsiooni puudumine mehaanilisele ärritajale.

▼B1.7.5.3. *Kõrvalekalded välimuses*

Vastsete arv, kelle kehakujus täheldatakse kõrvalekaldeid ja/või pigmentatsiooni, ja rebukoti imendumise etapp tuleks dokumenteerida võrdsete vaheaegade järel sõltuvalt katse kestusest ja kirjeldatud kõrvalekallete iseloomust. Tuleks märkida, et embrüote ja vastsete kõrvalekalded esinevad loomuliku arengu käigus ja nende osakaal võib teatud liikidel olla mitmeid protsente kontrollkatse(te) suhtes. Kõrvalekaldega loomad tuleb lihtsalt eemaldada katseanumast, kui need surevad.

1.7.5.4. *Kõrvalekalded käitumises*

Kõrvalekalded käitumises, nt hingeldamine, koordineerimata ujumine ja ebatüüpiline liikumatus tuleks registreerida piisavate vaheaegade järel sõltuvalt katse kestusest. Need mõjud, kuigi neid on raske kvantifitseerida, võivad jälgimise korral aidata tõlgendada suuremuse andmeid, st nendest võib saada teavet aine toksilisuse toimimisviisi kohta.

1.7.5.5. *Pikkus*

Katse lõpus on soovitatav mõõta individuaalsed pikkused; kasutada võib standardpikkust, pikkust ninamiku tipust kuni sabauime keskmiste kiirte alguseni või kogupikkust. Kui siiski esineb sabapoolset uimemädanikku või uimede erosiooni, tuleks kasutada standardpikkusi. Üldiselt peaks hästi läbiviidud katses pikkuse variatsioonikoeffitsient dubleerivates kontrollkatsetes olema ≤ 20 %.

1.7.5.6. *Kaal*

Katse lõpus võib mõõta individuaalsed kaalud; kuivmasse (24 tundi, 60 °C) eelistatakse märgmassidele (kuivaks pühituna). Üldiselt peaks hästi tehtud katses massi variatsioonikoeffitsient dubleerivates kontrollkatsetes olema ≤ 20 %.

Nendest vaatlustest saadakse andmeid järgneva statistilise analüüsi jaoks:

- kumulatiivne suuremus;
- tervete vastsete arv katse lõpus;
- koorumise alguse ja lõppemise aeg (st 90 % koorumine igas dubleerivas proovis);
- igal päeval kooruvate vastsete arv;
- ellujäänud loomade pikkus (ja kaal) katse lõpus;
- deformeerunud või ebatavalise välimusega vastsete arv;
- ebatavaliselt käituvate vastsete arv.

▼B**2. ANDMED JA ARUANDLUS****2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Katse kavandamisel ja analüüsimisel soovitatakse kaasata statistikut, kuna käesolev meetod võimaldab märkimisväärset varieerumist eksperimentaalses plaanis, näiteks katsekambrite arvus, uuritavate kontsentratsioonide arvus, viljastatud marjaterade algses arvus ja mõõdetavates parameetrites. Pidades silmas katse kavandamises olevaid võimalusi, ei ole siin antud konkreetseid juhiseid statistiliste menetluste kohta.

Kui tuleb määrata LOEC/NOEC, tuleb variatsioone analüüsida igas dubleerivas rühmas, kasutades dispersioonanalüüsi (ANOVA) või kooslustabeli menetlusi. Selleks, et teha mitmekordseid võrdlusi üksikute kontsentratsioonide ja kontrollkatsete kontsentratsioonide korral saadud tulemuste vahel, võiks olla kasu Dunnetti meetodist (12, 13). Olemas on teisi kasulikke näiteid (14, 15). ANOVA't või teisi menetlusi kasutades saadud mõju suurus (st katse jõud) tuleks välja arvutada ja avaldada. Tuleb märkida, et kõik punktis 1.7.5.6 toodud vaatlused ei sobi statistiliseks analüüsiks ANOVA abil. Kumulatiivse suremuse ja katse lõpus tervete vastsete arvu analüüsimiseks võiks kasutada probitmeetodeid.

Kui tuleb kindlaks määrata LC/EC_x, tuleks sobiv(ad) kõver(ad), näiteks logistiline kõver, sobitada huvipakkuvate andmetega selliste statistilise meetodi abil nagu näiteks vähimruutude meetod või mitte-lineaarne vähimruutude meetod. Kõvera(te)s tuleks kasutada selliseid muutujaid, et oleks võimalik otseselt hinnata ära soovitud LC/EC^x ja selle standardviga. See kergendab suuresti LC/EC^x jaoks usalduspiiri väljaarvutamist. Kui ei ole head põhjust eelistada erinevaid usaldusnivoosid, tuleks määrata kahepoolne 95 % usaldusnivoo. Kõverate sobitamise menetlus peaks eelistatavalt andma aluse sobitamise olulise või selle puudumise hindamiseks. Kõverate sobitamiseks võib kasutada graafilist meetodit. Regressioonanalüüs sobib kõikide punktis 1.7.5.6 esitatud vaatlusandmete kohta.

2.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Tulemuste tõlgendamisel tuleks olla ettevaatlik, kui uuritavates lahustes mõõdetud mürkaine kontsentratsioonid on analüütilise meetodi avastamispiiri lähedal. Tulemuste tõlgendamisel selliste kontsentratsioonide korral, mis on suuremad aine lahustuvusest vees, tuleks samuti olla ettevaatlik.

2.3. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

2.3.1. Uuritav aine:

- füüsikaline loomus ning olulised füüsikalise-keemilised omadused;
- keemilised identifitseerimisandmed, sealhulgas puhtus ja uuritava aine kvantifitseerimiseks kasutatav analüütiline meetod (vajaduse korral).

▼B**2.3.2. Katsealused liigid:**

- teaduslik nimi, liin, eellasteks olnud kalade arv (st kui mitut emaskala kasutati katses vajaliku arvu marjaterade saamiseks), päritolu ja viljastatud marjaterade kogumise meetod ning edaspidine käitlemine.

2.3.3. Katsetingimused:

- kasutatav katsemenetlus (nt poolstaatiline või läbivooluga, aeg viljastamisest uuringu alguseni, laadimine jne);
- fotoperiood(id);
- katse kavandamine (nt katse- ja dubleerivate anumate arv, embrüote arv dubleerivas katses);
- põhilahuse valmistamise meetod ja uuendamise sagedus (kui kasutatakse solubiliseerivat ainet, tuleb esitada ka selle kontsentratsioon);
- uuritavate kontsentratsioonide nimiväärtused, mõõdetud väärtused, nende saamise vahendid ja standardhälbed katseanumas ja meetod, mille alusel need on saadud, ning kui uuritava aine lahustuvus vees on uuritud kontsentratsioonidest väiksem, siis tuleks esitada tõendid selle kohta, et need mõõtmised vastavad uuritava aine kontsentratsioonidele lahuses;
- lahjendamiseks kasutatava vee omadused: pH, karedus, temperatuur, lahustunud hapniku kontsentratsioon, kloori jääktasemed (kui mõõdetakse), kogu orgaaniline süsinik, suspendeeritud tahked ained, katsekeskkonna soolsus (kui mõõdetakse) ja mis tahes muud tehtud mõõtmised;
- vee kvaliteet katseanumas: pH, karedus, temperatuur ja lahustunud hapniku kontsentratsioon.

2.3.4. Tulemused:

- uuritava aine püsivuse esialgsete uuringute tulemused;
- tõendid selle kohta, et kontrollkatsed vastasid katsealuste liikide korral üldisele aktsepteeritavale ellujäämise normile (2. ja 3. liide);
- andmed suremuse/ellujäämise kohta embrüo ja vastse staadiumites ning üldine suremus/ellujäämine;
- koorumiseks kulunud päevad ja koorunud isendite arv;
- andmed pikkuse (ja kaalu) kohta;
- võimalike morfoloogiliste kõrvalekallete esinemine ja kirjeldus;
- võimalike käitumises ilmnunud mõjude esinemine ja kirjeldus;
- statistiline analüüs ja andmete töötlemine;
- katsete puhul, milles kasutatakse ANOVA analüüsi: vähim toimet avaldava kontsentratsiooni (LOEC) $p = 0,05$ korral täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC) iga hinnatud vastuse kohta, kaasa arvatud kasutatud statistiliste menetluste kirjeldus ja viide selle kohta, milline oli avastatud mõju suurus;

▼B

— katsete puhul, milles kasutatakse regressioonitehnikat: LC/EC_x ja usaldusvahemikud ning selle arvutamiseks kasutatud sobitatud mudeli graafik;

— käesolevast katsemeetodist mis tahes kõrvalekallete selgitamine.

3. **VIITED**

- 1) Kristensen P. (1990). Evaluation of the Sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in Relation to other FELS Test Methods. Final report to the Commission of the European Communities, 60 pp. June 1990.
- 2) ASTM (1988). Standard Guide for Conducting Early Life-Stage Toxicity Tests with Fishes. American Society for Testing and Materials. E 1241-88. 26 pp.
- 3) Brauhn J. L. and Schoettger R. A. (1975). Acquisition and Culture of Research Fish: Rainbow trout, Fathead minnows, Channel Catfish and Bluegills. p. 54, Ecological Research Series, EPA-660/3-75-011, Duluth, Minnesota.
- 4) Brungs W. A. and Jones B. R. (1977). Temperature Criteria for Freshwater Fish: Protocol and Procedures. p. 128, Ecological Research Series EPA-600/3-77-061, Duluth, Minnesota.
- 5) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. J. Biol. 10, pp. 121–173.
- 6) Legault R. (1958). A Technique for Controlling the Time of Daily Spawning and Collecting Eggs of the Zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) Copeia, 4, pp. 328–330.
- 7) Dave G., Damgaard B., Grande M., Martelin J. E., Rosander B. and Viktor T. (1987). Ring Test of an Embryo-larval Toxicity Test with Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Using Chromium and Zinc as Toxicants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6, pp. 61–71.
- 8) Birge J. W., Black J. A. and Westerman A. G. (1985). Short-term Fish and Amphibian Embryo-larval Tests for Determining the Effects of Toxicant Stress on Early Life Stages and Estimating Chronic Values for Single Compounds and Complex Effluents. Environmental Toxicology and Chemistry 4, pp. 807–821.
- 9) Van Leeuwen C. J., Espeldoorn A. and Mol F. (1986). Aquatic Toxicological Aspects of Dithiocarbamates and Related Compounds. UI. Embryolarval Studies with Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). J. Aquatic Toxicology, 9, pp. 129–145.
- 10) Kirchen R. V. and W. R. West (1969). Teleostean Development. Carolina Tips 32(4): 1-4. Carolina Biological Supply Company.
- 11) Kirchen R. V. and W. R. West (1976). The Japanese Medaka. Its care and Development. Carolina Biological Supply Company, North Carolina. 36 pp.
- 12) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with Control. J. Amer. Statist. Assoc, 50, pp. 1096–1121.
- 13) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. Biometrics, 20, pp. 482–491.
- 14) Mc Clave J. T., Sullivan J. H. and Pearson J.G. (1980). Statistical Analysis of Fish Chronic Toxicity Test Data. Proceedings of 4th Aquatic Toxicology Symposium, ASTM, Philadelphia.

▼B

- 15) Van Leeuwen C. J., Adema D. M. M. and Hermes J. (1990). Quantitative Structure-Activity Relationships for Fish Early Life Stage Toxicity. *Aquatic Toxicology*, 16, pp. 321–334.
- 16) Environment Canada. (1992). Toxicity Tests Using Early Life Stages of Salmonid Fish (Rainbow Trout, Coho Salmon or Atlantic Salmon). Biological Test Method Series. Report EPS 1/RM/28, December 1992, 81 pp.
- 17) Dave G. and Xiu R. (1991). Toxicity of Mercury, Nickel, Lead and Cobalt to Embryos and Larvae of Zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. of Environmental Contamination and Toxicology*, 21, pp. 126–134.
- 18) Meyer A., Bierman C. H. and Orti G. (1993). The phylogenetic position of the Zebrafish (*Danio rerio*), a model system in developmental biology – an invitation to the comparative methods. *Proc. Royal Society of London, Series B*, 252: pp. 231–236.
- 19) Ghillebaert F., Chaillou C, Deschamps F. and Roubaud P. (1995). Toxic Effects, at Three pH Levels, of Two Reference Molecules on Common Carp Embryo. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32, pp. 19–28.
- 20) US EPA, (1991). Guidelines for Culturing the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*. EPA report EPA/600/3-91/064, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- 21) US EPA, (1991). Guidelines for Conducting Early Life Stage Toxicity Tests with Japanese Medaka, (*Oryzias latipes*). EPA report EPA/600/3-91/063, Dec. 1991, EPA, Duluth.
- 22) De Graeve G. M., Cooney J. D., McIntyre D. O., Poccocic T. L., Reichenbach N. G., Dean J. H. and Marcus M. D. (1991). Validity in the performance of the seven-day Fathead minnow (*Pimephales promelas*) larval survival and growth test: an intra- and interlaboratory study. *Environ. Tox. Chem.* 10, pp. 1189–1203.
- 23) Calow P. (1993). *Handbook of Ecotoxicology*, Blackwells, Oxford. Vol. 1, Chapter 10: Methods for spawning, culturing and conducting toxicity tests with Early Life stages of Estuarine and Marine fish.
- 24) Balon E. K. (1985). *Early life history of fishes: New developmental, ecological and evolutionary perspectives*, Junk Publ., Dordrecht, 280 pp.
- 25) Blaxter J. H. S. (1988). Pattern and variety in development, in: W. S. Hoar and D. J. Randall eds., *Fish Physiology*, Vol. XIA, Academic press, pp. 1–58.

Tabel 1a

Katseks soovitatavad kalaliigid

MAGEVEEKALAD

Oncorhynchus mykiss

Vikerforell (9, 16)

Danio rerio

Sebrakala (7, 17, 18)

Cyprinus caprio

Karpkala (8, 19)

Oryzias latipes

Jaapani riisikala (20, 21)

Pimephales promelas

Pakspea lepamaim (8, 22)

▼B

Tabel 1b

Näiteid teistest hästi dokumenteeritud liikidest, mida on samuti kasutatud

MAGEVEEKALAD	MEREKALAD
<i>Carassius auratus</i> Höbekoger (8)	<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside (23, 24, 25)
<i>Lepomis macrochirus</i> Bluegill (8)	<i>Clupea harengus</i> Harilik heeringas (24, 25)
	<i>Gadus morhua</i> Tursk (24, 25)
	<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow (23, 24, 25)



1.liide

JUHEND TOKSILISUSE KATSE TEGEMISEKS VÖÖDILISE PISIDAANIO (*BRACHYDANIO RERIO*) EMBRÜOTE JA REBUKOTIGA VASTSETEGA

SISSEJUHATUS

Vöödilise pisidaanio on pärit India Coromandeli rannikualalt, kus ta elutseb kiirevoolulistes jõgedes. Vöödilise pisidaanio on levinud akvaariumikala karpkallaste sugukonnast ja teavet tema hoolitsemise ja tema kasvatamise kohta võib leida tavalistes troopilisi kalu käsitlevates raamatutes. Ülevaate vöödilise pisidaanio bioloogiast ja kasutamisest kalandusalastes uuringutes on koostanud Laale (1).

Kala kasvab harva pikemaks kui 45 mm. Keha on silindrikujuline 7–9 tumesinise horisontaalse hõbedase triibuga. Need triibud ulatuvad sabapoolsete ja anaalsete uimedeni. Selg on oliivrohelist värvi. Isaskalad on emaskaladest saledamad. Emaskalad on hõbedasemad ja nende alakeha on laienenud, eriti enne kudemist.

Täiskasvanud kalad on võimelised taluma suuri temperatuuri-, pH- ja vee kareduse kõikumisi. Siiski tuleb selliste tervete kalade saamiseks, kellelt saaks kvaliteetseid marjaterasid, tagada optimaalsed tingimused.

Kudemise ajal ajab isaskala emaskala taga ja puksib teda ning kui emaskala väljutab marjaterad, siis need ka viljastatakse. Läbipaistvad ja mittekleepuvad marjaterad vajuvad põhja, kus täiskasvanud kalad võivad need ära süüa. Kudemist mõjutab valgus. Kui valgustingimused on hommikul piisavad, koeb vöödilise pisidaanio tavaliselt varajastel hommikutundidel pärast päikesetõusu.

Emaskala võib anda nädalaste vahedega mitmesajalisi marjaterade partiisid.

EELLASTEKS OLNUD KALADE, PALJUNEMISE JA VARAJASTE ELUSTAADIUMITE TINGIMUSED

Välja tuleks valida sobiv arv terveid kalasid ja hoida need sobivas vees (nt 4. liide) vähemalt kaks nädalat enne planeeritud kudemist. Kalade rühmal tuleks võimaldada vähemalt ühe korra sigida enne katses kasutatava marjaterade partiide saamist. Kalade tihedus selle perioodi jooksul ei tohiks olla suurem kui 1 gramm kalu liitri kohta. Regulaarne veevahetus või puhastussüsteemi kasutamine võib võimaldada suuremat tihedust. Temperatuur hoiuanumates tuleks hoida 25 + 2 °C. Kaladele tuleks anda vahelduvat toitu, mis võiks sisaldada näiteks sobivat kaubanduslikku kuivtoitu, elavaid just koorunud soolavähikesi (*Artemia*), surusääski, kiivrikke (*Daphnia*) ja valgeliimuklasi (*Enchytraeidae*).

Allpool on visandatud kaks menetlust, mida kasutades on saadud katseks vajalikul määral terveid, viljastatud marjaterasid.

- i) Kaheksa emaskala ja 16 isaskala pannakse anumasse, mis sisaldab 50 liitrit lahjendamiseks kasutatavat vett ja mis on varjatud otsese valguse eest ja mida häiritakse nii vähe kui võimalik vähemalt järgneva 48 tunni jooksul. Kudemiskandik asetatakse akvaariumi põhja katse algusele eelneva päeva pärastlõunal. Kudemiskandik koosneb (pleksiklaasist või muust sobivast materjalist) raamist kõrgusega 5–7 cm, millel on 2–5 mm silmadega jämedakoeline võrk üleval ja 10–30 µm tihe võrk põhjas. Raami jämedakoelise võrgu külge kinnitatakse mitmeid lahti keeratud nailonnööriest tehtud „kudemispuid“. Kui kalad on olnud pimedas 12 tundi, süüdatakse nõrk lamp, mis algatab kudemise. Kaks kuni neli tundi pärast kudemist eemaldatakse kudemiskandik ja marjaterad kogutakse kokku. Kudemiskandik takistab kaladel marjaterasid süüa ning samal ajal võimaldab see kergesti marjaterad kokku koguda. Kalade rühm peaks olema kudenud vähemalt ühe korra enne katses kasutatava marjaterade partii kudemist.

▼B

- ii) Viis kuni kümme isast ja emast kala hoitakse eraldi vähemalt kaks nädalat enne planeeritavat kudemist. 5–10 päeva pärast laienevad emaskalade alakehad ja nende genitaalide papillid muutuvad nähtavaks. Isakaladel nimeetatud papillid puuduvad. Kudemine toimub kudemisanumates, mis on varustatud võrgust tehtud väärpõhjaga (nagu eelpool). Anum täidetakse lahjendamiseks kasutatava veega nii, et vee sügavus võrgu kohal on 5–10 cm. Päev enne planeeritavat kudemist asetatakse mahutisse üks emaskala ja kaks isaskala. Vee temperatuuri tõstetakse, kuni see on ühe kraadi võrra kõrgem aklimatsioonitemperatuurist. Valgus kustutatakse ja anumat häiritakse nii vähe kui võimalik. Hommikul süüdatakse nõrk lamp, mis algatab kudemise. 2–4 tunni pärast eemaldatakse kalad ja marjaterad korjatakse kokku. Kui vajatakse suuremaid marjaterade partiiidid kui need, mida saab ühelt emaskalalt, võib üles seada piisaval hulgal paralleelseid kudemisanumaid. Kui registreeritakse iga emaskala paljunemise edukust enne katset (partii suurus ja kvaliteet), võib sigimiseks välja valida suurima reproduktiivsusega emaskalad.

Marjaterad tuleks viia katseanumasse klaastorude abil (sisediameter vähemalt 4 mm), millel on elastne imiotsak. Marjaterade ümberpaigutamisel kaasamineva vee hulk peaks olema võimalikult minimaalne. Marjaterad on veest raskemad ja vajuvad torust välja. Hoolitseda tuleks selle eest, et marjaterad (ja vastsed) ei puutuks kokku õhuga. Tuleks teha partii(de) proovi(de) mikroskoopiline uuring, et kindlustada esimestes arengustaadiumides anomaaliade puudumine. Marjaterade desinfitseerimine ei ole lubatud.

Marjaterade suremuse määr on kõrgem esimese 24 tunni jooksul pärast viljastamist. Selle perioodi jooksul on suremus sageli 5–40 %. Ebaõnnestunud viljastamise või arengukahjustuste tulemusel marjaterad degenerereeruvad. Marjaterade partii kvaliteet tundub sõltuvat emaskalast, kuna mõned emaskalad annavad pidevalt kvaliteetseid marjaterasid ja teised ei tee seda mitte kunagi. Samuti on erinevatel partiiidel erinev arenemis- ja koorumiskiirus. Edukalt viljastatud marjaterade ja rebukotivastsete ellujäämus on hea, tavaliselt üle 90 %. 25 °C juures kooruvad marjaterad 3.–5. päeval pärast viljastamist ning rebukott imendub ligikaudu 13. päeval pärast viljastamist.

Embrüonaalset arengut on hästi kirjeldanud Hisaoka ja Battle (2). Tänu marjaterade ja koorumisjärgsete vastsete läbipaistvusele on võimalik jälgida kalade arengut ja vaadelda väärarenguid. Ligikaudu neli tundi pärast kudemist on võimalik eristada viljastamata marjaterasid viljastatud marjateradest (3). Selle kindlakstegemiseks asetatakse marjaterad ja vastsed väikese ruumalaga katseanumatesse ja neid uuritakse mikroskoobi all.

Katsetingimused, mida rakendatakse varajastel elustaadiumitel, on esitatud 2. liites. Optimaalne lahjendamiseks kasutatava vee pH ja karedus on vastavalt 7,8 ja 250 mg CaCO₃/l.

ARVUTUSED JA STATISTIKA

Pakutakse välja kaheetapiline lähenemine. Kõigepealt analüüsitakse statistiliselt suremuse, väärarengu ja koorumise aega puudutavaid andmeid. Seejärel hinnatakse statistiliselt keha pikkust nende kontsentratsioonide korral, mille puhul ei täheldatud nimetatud parameetritele negatiivset mõju. Selline lähenemine on soovitatav, kuna mürkaine võib valikuliselt surmata väiksemad kalad, aeglustada koorumiseks vajalikku aega ja põhjustada suuri väärarenguid, mis toob endaga kaasa nihkega pikkuse mõõtmised. Lisaks on sellisel viisil võimalik mõõta ligikaudu sama arvu kalu iga menetluse korral, mis kindlustab katsestatistika validsuse.

▼BLC₅₀ JA EC₅₀ MÄÄRAMINE

Arvutatakse ellujäänud marjaterade ja vastsete arv ning seda korrigeeritakse vastavalt Abbotti valemile (4) suremusega kontrollkatsetes:

$$P = 100 - \left(\frac{C - P'}{C} \times 100 \right)$$

kus

P = korrigeeritud ellujäämise protsent

P' = uuritava kontsentratsiooni korral täheldatud ellujäämise protsent

C = ellujäämine kontrollkatsetes

Kui võimalik, määratakse katse lõpus sobivat meetodit kasutades LC₅₀.

Kui EC₅₀ statistikasse soovitakse lisada morfoloogiliste kõrvalekallete esinemist, võib vastavad juhised leida viitest Stephan (5).

LOEC JA NOEC HINDAMINE

Marjateradega ja rebukotiga vastsete uuringu eesmärk on võrrelda nullist erineva kontsentratsiooniga lahuseid kontrollkatsetega, st kindlaks määrata LOEC. Seetõttu tuleks kasutada korduvaid võrdlusmenetlusi (6, 7, 8, 9, 10).

VIITED

- 1) Laale H. W. (1977). The Biology and Use of the Zebrafish (*Brachydanio rerio*) in Fisheries Research. A Literature Review. *J. Fish Biol.* 10, pp. 121–173.
- 2) Hisaoka K. K. and Battle H. I. (1958). The Normal Development Stages of the Zebrafish *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan) *J. Morph.*, 102, 311 pp.
- 3) Nagel R. (1986). Untersuchungen zur Eiproduktion beim Zebraäbrbling (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan). *Journal of Applied Ichthyology*, 2, pp. 173–181.
- 4) Finney D. J. (1971). *Probit Analysis*, 3rd ed., Cambridge University Press, Great Britain, pp. 1–333.
- 5) Stephan C. E. (1982). Increasing the Usefulness of Acute Toxicity Tests. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference*, ASTM STP 766, J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop, Eds., American Society for Testing and Materials, pp. 69–81.
- 6) Dunnett C. W. (1955). A Multiple Comparisons Procedure for Comparing Several Treatments with a Control. *J. Amer. Statist. Assoc.* 50, pp. 1096–1121.
- 7) Dunnett C. W. (1964). New Tables for Multiple Comparisons with a Control. *Biometrics*, 20, pp. 482–491.
- 8) Williams D. A. (1971). A Test for Differences Between Treatment Means when Several Dose Levels are Compared with a Zero Dose Control. *Biometrics*, 27, pp. 103–117.
- 9) Williams D. A. (1972). The Comparison of Several Dose Levels with a Zero Dose Control. *Biometrics* 28, pp. 519–531.
- 10) Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981). *Biometry, the Principles and Practice of Statistics in Biological Research*, W. H. Freeman and Co., San Francisco.

KATSETINGIMUSED, KESTUS JA ELLUJÄÄMISKRITEERIUMID SOOVITATAVATE LIIKIDE JAOKS

Liik	Temperatuur (°C)	Soolsus (0/00)	Fotoperiood (tundides)	Etappide kestus (päevades)		Tüüpiline katse kestus	Ellujäämus kontrollkatses (minimaalne %)	
				Embrüo	Rebukotiga vastne		Koorumisprot- sent	Pärast koorumist
MAGEVEEKALAD								
<i>Brachydanio rerio</i> Vöödiline pisidaanio	25 ± 1	—	12–16	3–5	8–10	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 5 päeva pärast koorumist (8–10 päeva)	80	90
<i>Oncorhynchus mykiss</i> Vikerforell	10 ± 1 ⁽¹⁾ 12 ± 1 ⁽²⁾	—	0 ^(a)	30–35	25–30	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 20 päeva pärast koorumist (50–55 päeva)	66	70
<i>Cyprinus carpio</i> Harilik karpkala	21–25	—	12–16	5	> 4	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 4 päeva pärast koorumist (8–9 päeva)	80	75
<i>Oryzias latipes</i> Jaapani riisikala	24 ± 1 ⁽¹⁾ 23 ± 1 ⁽²⁾	—	12–16	8–11	4–8	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 5 päeva pärast koorumist (13–16 päeva)	80	80
<i>Pimephales promelas</i> Pakspea lepamaim	25 ± 2	—	16	4–5	5	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 4 päeva pärast koorumist (8–9 päeva)	60	70

⁽¹⁾ Embrüote puhul.

⁽²⁾ Vastsete puhul.

^(a) Embrüod ja vastsed pimeduses kuni üks nädal pärast koorumist, välja arvatud ülevaatamise ajal. Seejärel vähene valgus kogu katse jooksul.

Katsetingimused, kestus ja ellujäämiskriteeriumid teiste hästi dokumenteeritud liikide korral

Liik	Temperatuur (°C)	Soolsus (0/00)	Fotoperiood (Tundides)	Etappide kestus (Päevades)		Tüüpiline embrüote ja rebukotiga vastsete katse kestus	Ellujäämus kontrollkatses (minimaalne %)	
				Embrüo	Rebukotiga vastne		Koorumisprotsent	Pärast koorumist
MAGEVEEKALAD								
<i>Carassius auratus</i> Kuldkala	24 ± 1	—	—	3–4	> 4	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 4 päeva pärast koorumist (7 päeva)	—	80
<i>Leopomis macrochirus</i> Bluegill kuukala	21 ± 1	—	16	3	> 4	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 4 päeva pärast koorumist (7 päeva)	—	75
MEREKALAD								
<i>Menidia peninsulae</i> Tidewater silverside	22–25	15–22	12	1,5	10	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 5 päeva pärast koorumist (6–7 päeva)	80	60
<i>Clupea harengus</i> Heeringas	10 ± 1	8–15	12	20–25	3–5	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 3 päeva pärast koorumist (23–27 päeva)	60	80
<i>Gadus morhua</i> Tursk	5 ± 1	5–30	12	14–16	3–5	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 3 päeva pärast koorumist (18 päeva)	60	80
<i>Cyprinodon variegatus</i> Sheepshead minnow	25 ± 1	15–30	12	—	—	Võimalikult kohe pärast viljastamist (varane gastrulafaas) kuni 4/7 päeva pärast koorumist (28 päeva)	> 75	80

▼B

4. LIIDE

**MÕNED AKTSEPTEERITAVA LAHJENDAMISEKS KASUTATAVA
VEE KEEMILISED OMADUSED**

Aine	Kontsentratsioonid
Tahked ained osakestena	< 20 mg/l
Kogu orgaaniline süsinik	< 2 mg/l
Ammoniaak (ioniseerimata)	< 1 µg/l
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide kogusisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülid kogusisaldus	< 50 ng/l
Kloori kogusisaldus orgaanilistes ühendites	< 25 ng/l

▼B**C.16. MESILASED – AKUUTSE SUUKAUDSE TOKSILISUSE KATSE****1. MEETOD**

Käesolev akuutse toksilisuse katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 213 (1998).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev toksilisuse katse on laboratoorne meetod, mis on kavandatud taimekaitsetoodete ja teiste kemikaalide suukaudse akuutse toksilisuse hindamiseks täiskasvanud töomesilaste abil.

Ainete toksiliste omaduste hindamisel võib nõuda akuutse suukaudse toksilisuse kindlaksmääramist mesilaste puhul, st siis, kui mesilaste kokkupuutumine antud kemikaaliga on tõenäoline. Akuutse suukaudse toksilisuse uuring tehakse selleks, et määrata kindlaks pestitsiidide ja teiste kemikaalide toksilisus mesilatele. Käesoleva katse tulemusi tuleks kasutada edasise hindamise vajaduse määramiseks. Täpsemalt võib seda meetodit kasutada programmides, milles pestitsiidide poolt mesilatele tekitatud ohte hinnatakse astmeliselt, ja mis põhinevad järjestikusel üleminekul toksilisuse laboratoorsete katsete juurest poolväli- ja välikatseteni (1). Pestitsiide võib uurida nii toimeainetena kui ka valmististena.

Mesilaste tundlikkuse ja katsemenetluse täpsuse kindlakstegemiseks tuleks kasutada toksilisuse standardit.

1.2. MÕISTED

Akuutne suukaudne toksilisus – negatiivne mõju, mis ilmneb hiljemalt 96 tunni jooksul pärast uuritava aine ühe doosi suukaudset manustamist.

Doos – tarbitud uuritava aine kogus. Doosi väljendatakse uuritava aine massina (μg) katselooma kohta ($\mu\text{g}/\text{mesilane}$). Tegelikku doosi iga mesilase kohta ei saa välja arvutada, kuna mesilasi söödetakse kollektiivselt, kuid kindlaks on võimalik teha keskmine doos (kogu tarbitud uuritava aine/mesilaste arv ühes puuris).

LD₅₀ (letaalse doosi mediaan), suukaudne – statistiliselt saadud aine ühekordne doos, mis võib suukaudsel manustamisel põhjustada surma 50 %-l isenditest. LD₅₀ väärtus avaldatakse uuritava aine mikrogrammides (μg) mesilase kohta. Pestitsiidide korral võib uuritav aine olla kas toimeaine või valmistis, milles on üks või mitu toimeainet.

Suremus – isend loetakse surnuks, kui see on täielikult liikumatu.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Täiskasvanud töomesilased (*Apis mellifera*) viiakse kokku sahharoosilahuses dispergeeritud uuritava aine erinevate doosidega. Seejärel söödetakse mesilatele sama toitu ilma uuritava aineta. Suremus registreeritakse iga päev vähemalt 48 tunni jooksul ja võrreldakse kontrollkatsete saadud väärtustega. Kui suremuse määr suureneb 24 h ja 48 h vahel ning kui suremus kontrollrühmas jääb aktsepteeritavale tasemele, st < 10 %, on katse kestust sobiv maksimaalselt 96 tunnini pikendada. Tulemusi analüüsitakse, et arvutada välja LD₅₀ väärtused 24. ja 48. tunni jaoks ja juhul, kui uuringut pikendatakse, siis ka 72. ja 96. tunni jaoks.

▼B

1.4. KATSE VALIIDSUS

Katse valiidsuse kohta kehtivad järgmised tingimused:

— keskmine suremus kõikides kontrollkatsetes kokku ei tohi katse lõpul ületada 10 %;

— toksilisuse standard LD₅₀ vastab kõnealusele vahemikule.

1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.5.1. Mesilaste kogumine

Kasutada tuleks sama tõugu noori töomesilasi, st mesilased peaksid olema samas vanuses, samamoodi toidetud jne. Mesilased peaksid olema pärit piisavalt toidetud, tervetest ja võimalikult haigusvabamatest mesilasemaga kolooniatest, millel on tuntud ajalugu ja füsioloogiline staatus. Mesilased tuleks kokku koguda kasutamispäeva hommikul või katsele eelneval õhtul ja hoida uuringu tingimustes järgmise päevani. Sobivad on need mesilased, mis on kogutud raamidelt, millel ei ole pesakondi. Tuleks vältida kogumist varakevadel või hilissügisel, kuna mesilaste füsioloogia on sellel ajal muutunud. Kui katse tuleb teha varakevadel või hilissügisel, võib mesilastel lasta kooruda inkubaatoris ja neid võib kasvatada ühe nädala jooksul „mesilasleival“ (kärjest kogutud õietolm) ja sahharoosilahusega. Toksilisuse katses ei tohiks kasutada mesilasi, keda on ravitud keemiliste ainetega, näiteks antibiootikumid, varroatoosivastased tooted jms nelja nädala jooksul alates viimase ravimenetluse lõpust.

1.5.2. Pidamis- ja söötmingimused

Kasutatakse kergesti puhastatavaid ja hästiventileeritud puure. Kasutada võib mis tahes materjalist, nt roostevabast terasest, traatvõrgust, plastmassist puure või ühekordselt kasutatavad puupuure jms. Eelistsatav mesilaste arv on kümme mesilast puuri kohta. Katsepuuri suurus peaks olema sobiv mesilaste arvuga, st tagama piisava ruumi.

Mesilased tuleks hoida katseruumis pimedas temperatuuril 25 ± 2 °C. Kogu katse jooksul tuleks registreerida suhteline õhuniiskus, mis normaalselt on ligikaudu 50–70 %. Käitlemisemenetlusi, sealhulgas ainega töötlemist ja vaatlusi, võib teha (päeva)valguses. Toiduks kasutatakse sahharoosi vesilahust, mille lõppkontsentratsioon on 500 g/l (50 massi-/mahuprotsenti). Pärast nimetatud uuri-tava doosi andmist tuleks toitu anda *ad libitum*. Toitmissüsteem peaks võimaldama registreerida toidu manustamise iga puuri kohta (vt punkti 1.6.3.1). Kasutada võib klaastoru (ligikaudu 50 mm pikk ja 10 mm läbimõõduga, mille avatud ots kitseneb kuni ligikaudu 2 millimeetrini).

1.5.3. Mesilaste ettevalmistamine

Kogutud mesilased jagatakse juhuvaliku alusel katsepuuridesse, mille paigutus katseruumis on juhuslik.

▼B

Mesilastele võib toitu mitte anda kuni 2 tundi enne katse algust. Mesilastele soovitatakse enne aine mõjule allutamist toitu mitte anda, et kõik mesilased oleksid katse alguses seedekulgla sisu mõttes võrdses olukorras. Surevaid mesilasi ei tuleks kasutada ja need asendatakse enne katse algust tervete mesilastega.

1.5.4. Dooside ettevalmistamine

Kui uuritav aine on veega segunev ühend, võib selle disperseerida kohe 50 % sahharoosilahuses. Tehniliste valmististe ja madala veeslahustuvusega ainete korral võib kasutada kandeaineid, näiteks orgaanilised lahustid, mesilastele vähemürgised emulgaatorid või dispergandid (nt atsetoon, dimetüülformamiid, dimetüülsulfoksiid). Kandeaine kontsentratsioon sõltub uuritava aine lahustuvusest ja see peaks olema sama kõikide uuritavate kontsentratsioonide korral. Siiski on üldiselt sobiv kandeainekontsentratsioon 1 % ja seda ei tohiks ületada.

Tuleks valmistada sobivad kontroll-lahused, st kui uuritava aine lahustamiseks kasutatakse lahustit või disperganti, tuleks kasutada kahte iseseisvat kontrollrühma: vesilahust ja sahharoosilahust, milles lahusti/kandeaine kontsentratsioon on sama mis doseerimislahustes.

1.6. KATSE KÄIK

1.6.1. Katse- ja kontrollrühmad

Uuritavate dooside ja duplikaatide arv peaks vastama statistilistele nõuetele LD₅₀ kindlaksmääramiseks 95 % usalduspiiriga. Tavaliselt nõutakse katse jaoks viit doosi geomeetrilises jadas, mille tegur ei ületa 2.2 ja mis katavad LD₅₀ jaoks vajaliku vahemiku. Siiski tuleb lahendusaste ja doseeritavate kontsentratsioonide arv kindlaks määrata vastavalt toksilisuskõvera (doos vs suremus) tõusule ja tulemuste analüüsimiseks valitud statistilisele meetodile. Vahemiku kindlaksmääramise katse võimaldab valida välja doseerimiseks sobivad kontsentratsioonid.

Iga uuritava kontsentratsiooniga lahust tuleks doseerida vähemalt kolmele dubleerivale katserühmale, milles igas on 10 mesilast. Lisaks katseeriale tuleks kasutada vähemalt kolme kontrollpartiit, milles igaühes on 10 mesilast. Kontrollpartiit peaksid olema ka kasutatavate lahustite/kandainete jaoks (vt punkti 1.5.4).

1.6.2. Toksilisuse standard

Katseerias peaks olema ka toksilisuse standard. Eeldatava LD₅₀ väärtuse katmiseks tuleks valida vähemalt kolm doosi. Iga uuritavat doosi tuleks kasutada vähemalt kolme dubleeriva puuri korral, milles igaühes on 10 mesilast. Eelistatav toksilisuse standard on dimetooat, mille peroraalse LD₅₀ dokumenteeritud väärtus 24 tunni jaoks on vahemikus 0,10–0,35 µg toimeainet mesilase kohta (2). Siiski võib kasutada ka teisi toksilisuse standardeid juhul, kui on võimalik hankida piisavalt andmeid, et tõestada eeldatud reaktsiooni doosile (nt paratioon).

▼B1.6.3. **Kokkupuude**1.6.3.1. *Doseerimine*

Igale mesilaste katserühmale tuleb anda 100–200 µl 50 % sahharoosi vesilahust, mis sisaldab sobivas kontsentratsioonis uuritavat ainet. Suuremat ruumala on vaja vähelahustuvate, madala toksilisusega või valmistises madala kontsentratsiooniga toodete korral, sest siis tuleb sahharoosilahuses kasutada suuremaid koguseid. Rühma kohta manustatud töödeldud toidu hulka tuleb jälgida. Pärast tarbimist (tavaliselt 3–4 tunni jooksul) tuleb toitesead eemaldada puurist ja asendada teisega, mis sisaldab ainult sahharoosilahust. Sahharoosilahuseid antakse seejärel *ad libitum*. Mõningate ühendite puhul võib suure kontsentratsiooniga uuritavatest doosidest keeldumine põhjustada selle, et toitu tarbitakse vähe või üldse mitte. Töödeldud toit, mida ei ole tarbitud maksimaalselt 6 tunni jooksul, tuleks asendada ainult sahharoosilahusega. Tarbitud töödeldud toidu hulka tuleks hinnata (nt järelejäänud töödeldud toidu ruumala/massi mõõtmine).

1.6.3.2. *Kestus*

Katse kestus on eelistatavalt 48 tundi alates uuritava lahuse asendamisest ainult sahharoosi sisaldava lahusega. Kui suremus tõuseb jätkuvalt rohkem kui 10 % pärast esimest 24 tundi, tuleks katse kestust pikendada maksimaalselt 96 tunnini, eeldusel, et suremus kontrollrühmas ei ületa 10 %.

1.6.4. **Vaatlused**

Suremus registreeritakse 4. tunnil pärast katse algust ja seejärel 24. ja 48. tunnil (st pärast doseerimist). Kui osutub vajalikuks pikendatud vaatlusperiood, tuleks edasisi hindamisi teha 24tunniste vahedega kuni 96. tunnini, eeldusel et suremus kontrollkatsetes ei ületa 10 %.

Rühma kohta manustatud toidu hulk tuleb kindlaks määrata. Töödeldud ja töötlemata toidu tarbimismäärade võrdlemine antud 6 tunni jooksul võib anda teavet töödeldud toidu maitsevuse kohta.

Kõik katseperioodi jooksul tuvastatud kõrvalekalded käitumises tuleks registreerida.

1.6.5. **Piirsalduskatse**

Teatud juhtudel (nt kui eeldatakse, et uuritav aine on madala toksilisusega) tuleks teha piirsalduskatse, kasutades 100 µg toimeainet mesilase kohta, eesmärgiga näidata, et LD₅₀ on sellest väärtusest suurem. Tuleks kasutada sama menetlust, st seal peaks olema kolm dubleerivat katserühma uuritava doosi kohta, asjaomased kontrollkatset, tarbitud töödeldud toidu koguse hindamine ning toksilisuse standardi kasutamine. Kui esineb suremust, tuleks teha täielik uuring. Kui täheldatakse subletaalseid mõjusid (vt punkti 1.6.4), tuleks need registreerida.

▼B**2. ANDMED JA ARUANDLUS****2.1. ANDMED**

Andmed tuleks kokku võtta tabelina, näidates ära iga menetlusrühma, kontrollrühma ja toksilisuse standardi rühma kohta kasutatud mesilaste arvu, suremuse iga vaatlusaja kohta ja ebatavalise käitumisega mesilaste arvu. Suremuse andmeid tuleks analüüsida sobiva statistilise meetodiga (nt probitanalüüs, libisev keskväärts, binomiaalne tõenäosus) (3, 4). Doosi-reaktsiooni sõltuvused koostatakse iga soovitatava vaatlusaja kohta ja arvutatakse kõverate tõusud ning letaalse doosi mediaanid (LD_{50}) 95 % usalduspiiri jaoks. Kontrollrühma suremust võib korrigeerida, kasutades Abbotti korrigeerimist (4, 5). Kui töödeldud toit ei ole täielikult tarbitud, tuleks kindlaks määrata tarbitud uuritava aine doos rühma lõikes. LD_{50} tuleks avaldada uuritava aine μg -des mesilase kohta.

2.2. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

2.2.1. Uuritav aine:

- füüsikaline loomus ning olulised füüsikalise-keemilised omadused (nt püsivus vees, aururõhk);
- keemilised identifitseerimisandmed, sealhulgas struktuurivalem, puhtus (st pestitsiidide korral toimeaine(te) loomus ja kontsentratsioon).

2.2.2. Katsealused liigid:

- teaduslik nimi, tõug, ligikaudne vanus (nädalates), kogumismeetod, kogumise kuupäev;
- teave katsemesilaste kogumiseks kasutatud kolooniate kohta, sealhulgas nende tervisliku seisundi, täiskasvanud isendite haiguste, eelneva ravi jms kohta.

2.2.3. Katsetingimused:

- katseruumi temperatuur ja suhteline õhuniiskus;
- pidamistingimused, sealhulgas puuride tüüp, suurus ja materjal;
- põhi- ja katselahuste valmistamismeetodid (kui kasutatakse lahustit, tuleb esitada ka selle nimetus ja kontsentratsioon);
- katse kavandamine, nt kasutatavad uuritavad kontsentratsioonid ja nende arv, kontrollkatsete arv; iga uuritava kontsentratsiooni ja kontrollrühma kohta dubleerivate puuride arv ja mesilaste arv puuri kohta;
- katse kuupäev.

▼B2.2.4. **Tulemused:**

- kui tehakse esialgse vahemiku leidmise uuring, siis selle tulemused;
- lähteandmed: suremus iga doosi lõikes igal vaatlushetkel;
- doosi-reaktsiooni sõltuvuse graafik katse lõpus;
- LD₅₀ väärtused 95 % usalduspiiriga iga soovitatava vaatlushetke lõikes uuritava aine ja toksilisuse standardi kohta;
- LD₅₀ kindlaksmääramiseks kasutatud statistilised menetlused;
- suremus kontrollrühmades;
- muu täheldatud või mõõdetud bioloogiline mõju, nt kõrvalekalded mesilaste käitumises (kaasaarvatud uuritavast doosist keeldumine), toidu tarbimise määr töödeldud ja töötlemata rühmades;
- mis tahes kõrvalekalle siinkirjeldatud katsemenetlustest ja muu oluline teave.

3. **VIITED**

- 1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO Bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151–165. March 1993.
- 2) Gough, H. J., McIndoe, E.C., Lewis, G.B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.) 1981-1992. Journal of Apicultural Research, 22, pp. 119–125.
- 3) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99–113.
- 4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- 5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol., 18, pp. 265–267.

▼B**C.17. MESILASED – AKUUTSE KONTAKTTOKSILISUSE KATSE****1. MEETOD**

Käesolev akuutse toksilisuse katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 214 (1998).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev toksilisuse katse on laboratoorne meetod, mis on kavandatud taimekaitsetoodete ja teiste kemikaalide akuutse kontakttoksilisuse hindamiseks täiskasvanud töomesilastele.

Ainete toksiliste omaduste hindamisel võib nõuda akuutse kontakttoksilisuse kindlaksmääramist mesilaste puhul, st siis, kui on tõenäoline mesilaste kokkupuutumine antud kemikaaliga. Akuutse kontakttoksilisuse katse tehakse selleks, et kindlaks määrata pestitsiidide ja teiste kemikaalide toksilisus mesilastele. Käesoleva katse tulemusi tuleks kasutada edasise hindamise vajaduse määramiseks. Täpsemalt võib seda meetodit kasutada programmides, milles pestitsiidide poolt mesilastele tekitatud ohte hinnatakse astmeliselt ja mis põhinevad järjestikulisel üleminekul toksilisuse laboratoorsete katsete juurest poolväli- ja välikatseteni (1). Pestitsiide võib uurida nii toimeainetena kui ka valmististena.

Mesilaste tundlikkuse ja katsemenetluse täpsuse kindlakstegemiseks tuleks kasutada toksilisuse standardit.

1.2. MÕISTED

Akuutne kontakttoksilisus – negatiivne mõju, mis ilmneb hiljemalt 96 tunni jooksul pärast uuritava aine ühe doosi pealekandmist.

Doos – pealekantava uuritava aine kogus. Doosi väljendatakse uuritava aine massina (μg) katselooma kohta ($\mu\text{g}/\text{mesilane}$).

LD₅₀ (letaalse doosi mediaan) kontakti korral – statistiliselt saadud aine ühekordne doos, mis võib kontaktmanustamisel põhjustada surma 50 % isenditest. LD₅₀ väärtust väljendatakse uuritava aine mikrogrammides (μg) mesilase kohta. Pestitsiidide korral võib uuritava aine olla kas toimeaine või valmistis, milles on üks või mitu toimeainet.

Suremus – isend loetakse surnuks, kui see on täielikult liikumatu.

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Täiskasvanud töomesilased (*Apis mellifera*) viiakse kokku sobivas kandeaines lahustatud uuritava aine erinevate doosidega, kandes need otse rindkerele (tilkadena). Katse kestus on 48 tundi. Kui suremuse määr suureneb 24 h ja 48 h vahel ning kui suremus kontrollrühmas jääb aktsepteeritavale tasemele, st < 10 %, on sobiv katse kestust pikendada maksimaalselt 96 tunnini. Suremust registreeritakse iga päev ja võrreldakse kontrollrühmas saadud väärtustega. Tulemused analüüsitakse, et arvutada välja LD₅₀ väärtused 24. ja 48. tunni jaoks ja juhul, kui uuringut pikendatakse, siis ka 72. ja 96. tunni jaoks.

▼B

1.4. KATSE VALIIDSUS

Katse valiidsuse kohta kehtivad järgmised tingimused:

- keskmine suremus kõikides kontrollkatsetes kokku ei tohi katse lõpul ületada 10 %;
- toksilisuse standard LD₅₀ vastab kõnealusele vahemikule.

1.5. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.5.1. Mesilaste kogumine

Kasutada tuleks sama tõugu noori töomesilasi, st mesilased peaksid olema samas vanuses, samamoodi toidetud, sama tõugu jne. Mesilased peaksid olema pärit piisavalt toidetud, tervetest ja võimalikult haigusvabamatest mesilasemaga kolooniatest, millel on tuntud ajalugu ja füsioloogiline staatus. Mesilased tuleks kokku koguda kasutamispäeva hommikul või katsele eelneval õhtul ja hoida katse tingimustes järgmise päevani. Sobivad on need mesilased, mis on kogutud raamidelt, millel ei ole pesakondi. Tuleks vältida kogumist varakevadel või hilissügisel, kuna mesilaste füsioloogia on sellel ajal muutunud. Kui katse tuleb teha varakevadel või hilissügisel, võib mesilastel lasta kooruda inkubaatoris ja neid võib kasvatada ühe nädala jooksul „mesilasleival“ (kärjest kogutud õietolm) ja sahharoosilahusega. Toksilisuse katses ei tohiks kasutada mesilasi, keda on ravitud keemiliste ainete, näiteks antibiootikumid, varroatoosivastased tooted jms, nelja nädala jooksul alates viimase ravimenetluse lõpust.

1.5.2. Pidamis- ja söötmingimused

Kasutatakse kergesti puhastatavaid ja hästiventileeritud puure. Kasutada võib mis tahes materjalist, nt roostevabast terasest, traatvõrgust, plastmassist puure või ühekordselt kasutatavaid puupuure jms. Katsepuuride suurus peaks olema vastavauses mesilaste arvuga, st tagama piisava ruumi. Eelistatav mesilaste arv on kümme mesilast puuri kohta.

Mesilased tuleks hoida katseruumis pimedas temperatuuril 25 + 2 °C. Kogu uuringu jooksul tuleks registreerida suhteline õhuniiskus, mis normaalselt on ligikaudu 50–70 %. Käitlemismenetlusi, sealhulgas ainega töötlemist ja vaatlusi võib teha (päeva)valguses. Toiduks tuleks kasutada sahharoosi vesilahust, mille lõppkontsentratsioon on 500 g/l (50 massi-/mahuprotsenti) ja seda tuleks anda katse jooksul ad libitum, kasutades mesilaste toiteseadet. Selleks võib olla klaastoru (ligikaudu 50 mm pikk ja 10 mm läbimõduga, mille avatud ots kitseneb kuni ligikaudu 2 millimeetriteni).

1.5.3. Mesilaste ettevalmistamine

Pärast kogumist võib mesilased uuritava aine pealepanemiseks tuimestada süsinikdioksiidi või lämmastikuga. Kasutatava tuimasti kogus ja kokkupuuteaeg tuleks hoida minimaalsena. Surevaid mesilasi ei tuleks kasutada ja need asendatakse enne katse algust tervete mesilastega.

1.5.4. Dooside ettevalmistamine

Uuritav aine tuleb peale kanda kandaines oleva lahuse, st orgaanilises lahustis või vesilahuses, mis sisaldab mürgavat ainet. Orgaanilise lahustina eelistatakse atsetooni, kuid kasutada võib ka teisi mesilastele vähemürgiseid orgaanilisi lahusteid (nt dimetüülformamiidi, dimetüülsulfoksiidi). Vees dispergeeritud valmistise ja orgaanilistes kandelahustites mittelahustuvate väga polaarsete orgaaniliste ainete lahuseid on lihtsam kasutada siis, kui need on valmistatud müügiloleva mürgava aine (nt Agral, Citterwett, Lubrol, Triton, Tween) lahjas lahuses.

▼B

Valmistada tuleks sobivad kontroll-lahused, st kui kasutatakse lahustit või disperganti uuritava aine lahustamiseks, tuleks kasutada kahte iseseisvat kontrollrühma: üks, milles kasutatakse vett ja teine milles kasutatakse lahustit/disperganti.

1.6. KATSE KÄIK

1.6.1. **Katse- ja kontrollrühmad**

Dooside ja uuritud duplikaatide arv peaks vastama statistilistele nõuetele LD₅₀ kindlaksmääramiseks 95 % usalduspiiriga. Tavaliselt nõutakse katse jaoks viit doosi geomeetrilises jadas, mille tegur ei ületa 2.2 ja mis katavad LD₅₀ jaoks vajaliku vahemiku. Siiski tuleb dooside arv kindlaks määrata vastavalt toksilisuskõvera (doos vs suremus) tõusule ja tulemuste analüüsimiseks valitud statistilisele meetodile. Vahemiku kindlaksmääramise katse võimaldab valida välja sobivaid doose.

Iga uuritava kontsentratsiooniga lahust tuleks doseerida vähemalt kolmele dubleerivale katserühmale, milles igas on 10 mesilast.

Lisaks katseeriale tuleks kasutada vähemalt kolme kontrollpartiit, milles igaühes on 10 mesilast. Kui kasutatakse orgaanilist lahustit või mürgavat ainet, tuleb kasutada lahustit või mürgava aine kohta kolme täiendavat kontrollpartiit, milles igaühes on 10 mesilast.

1.6.2. **Toksilisuse standard**

Katseerias peab olema ka toksilisuse standard. Eeldatava LD₅₀ väärtuse katmiseks tuleks valida vähemalt kolm doosi. Iga uuritavat doosi tuleks kasutada vähemalt kolme dubleeriva puuri korral, milles igaühes on 10 mesilast. Eelistatav toksilisuse standard on dimetooat, mille kontaktse LD₅₀ dokumenteeritud väärtus 24 tunni jaoks on vahemikus 0,10–0,30 µg toimeainet mesilase kohta (2). Siiski võib kasutada ka teisi toksilisuse standardeid juhul, kui on võimalik hankida piisavalt andmeid, et tõestada eeldatud reaktsiooni doosile (nt paratioon).

1.6.3. **Kokkupuude**1.6.3.1. *Doseerimine*

Tuimestatud mesilastele kantakse uuritavat ainet peale individuaalselt. Mesilased määratakse juhuvaliku alusel erinevatele uuritavatele doosidele allutatavatesse rühmadesse ja kontrollrühmadesse. Iga mesilase rindkere selgmisele küljele määratakse peale mikroaplikaatoriga 1 µl uuritavat ainet sobivas kontsentratsioonis sisaldavat lahust. Kasutada võib ka muid koguseid, kui see on õigustatud. Pärast pealekandmist jagatakse mesilased katsepuuridesse ja neile antakse sahharoosilahust.

1.6.3.2. *Kestus*

Katse kestus on eelistatavalt 48 tundi. Kui suremus tõuseb 24 ja 48 tunni vahel rohkem kui 10 %, tuleks katse kestust pikendada maksimaalselt 96 tunnini eeldusel, et suremus kontrollrühmas ei ületa 10 %.

▼B**1.6.4. Vaatlused**

Suremus registreeritakse 4. tunnil pärast doseerimist ja seejärel 24. ja 48. tunnil. Kui osutub vajalikuks vaatlusperioodi pikendada, tuleks teha edasisi hindamisi 24tunniste vahedega kuni 96. tunnini eeldusel, et suremus kontrollrühmas ei ületa 10 %.

Kõik katseperioodi jooksul tuvastatud kõrvalekalded käitumises tuleks registreerida.

1.6.5. Piirsalduskatse

Teatud juhtudel (nt kui eeldatakse, et uuritav aine on madala toksilisusega) tuleks teha piirsalduskatse, kasutades 100 µg toimeainet mesilase kohta, eesmärgiga näidata, et LD₅₀ on sellest väärtusest suurem. Tuleks kasutada sama menetlust, st seal peaks olema kolm dubleerivat katserühma uuritava doosi kohta, asjaomased kontrollkatseted ning toksilisuse standardi kasutamine. Kui esineb suremust, tuleks teha täielik uuring. Kui täheldatakse subletaalseid mõjusid (vt punkti 1.6.4), tuleks need registreerida.

2. ANDMED JA ARUANDLUS**2.1. ANDMED**

Andmed tuleks kokku võtta tabelina, näidates ära iga menetlusrühma, kontrollrühma ja toksilisuse standardi rühma kohta kasutatud mesilaste arvu, suremuse iga vaatlusaja kohta ja ebatavalise käitumisega mesilaste arvu. Suremuse andmeid tuleks analüüsida sobiva statistilise meetodiga (nt probitanalüüs, libisev keskväärutus, binomiaalne tõenäosus) (3, 4). Sõltuvuse doos-reaktsioon koostatakse iga soovitatava vaatlusaja (st 24. h, 48. h ja kui kasutatakse, siis ka 72. h ja 96. h) kohta ja arvutatakse kõverate tõusud ning letaalse doosi mediaanid (LD₅₀) 95 % usalduspiiri jaoks. Kontrollrühma suremust võib korrigeerida, kasutades Abbotti korrigeerimist (4, 5). LD₅₀ tuleks avaldada uuritava aine µg-des mesilase kohta.

2.2. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

2.2.1. Uuritav aine:

- füüsikaline loomus ning füüsikalise-keemilised omadused (nt püsivus vees, aururõhk);
- keemilised identifitseerimisandmed, sealhulgas struktuurivalem, puhtus (st pestitsiidide korral toimeaine(te) loomus ja kontsentratsioon).

2.2.2. Katsealused liigid:

- teaduslik nimi, tõug, ligikaudne vanus (nädalates), kogumismeetod, kogumise kuupäev;
- teave katsemesilaste kogumiseks kasutatud kolooniate kohta, sealhulgas nende tervisliku seisundi, täiskasvanud isendite haiguste, eelneva ravi jms kohta.

▼B**2.2.3. Katsetingimused:**

- katseruumi temperatuur ja suhteline õhuniiskus;
- pidamistingimused, sealhulgas puuride tüüp, suurus ja materjal;
- uuritava aine manustamise meetodid, nt kasutatud kandelahus, pealekantud uuritava lahuse ruumala, kasutatud tuimasti;
- katse kavandamine, nt kasutatud uuritavad doosid ja nende arv, kontrollkatsete arv; iga uuritava doosi ja kontrollrühma kohta dubleerivate puuride arv ja mesilaste arv puuri kohta;
- katse kuupäev.

2.2.4. Tulemused:

- kui tehakse esialgse vahemiku leidmise uuring, siis selle tulemused;
- lähteandmed: suremus iga uuritud kontsentratsiooni kohta igal vaatlushetkel;
- doosi-reaktsiooni sõltuvuse graafik katse lõpus;
- LD₅₀ väärtused 95 % usalduspiiriga iga soovitatava vaatlushetke lõikes uuritava aine ja toksilisuse standardi kohta;
- LD₅₀ kindlaksmääramiseks kasutatud statistilised menetlused;
- suremus kontrollrühmades;
- muu täheldatud või mõõdetud bioloogiline mõju ja mesilaste mis tahes ebatavalised reaktsioonid;
- mis tahes kõrvalekalded siinkirjeldatud katsemeetodi menetlustest ja muu oluline teave.

3. VIITED

- 1) EPPO/Council of Europe (1993). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Products – Honeybees. EPPO bulletin, Vol. 23, N.1, pp. 151–165. March 1993.
- 2) Gough, H. J., McIndoe, E. C., Lewis, G. B. (1994). The use of dimethoate as a reference compound in laboratory acute toxicity tests on honeybees (*Apis mellifera* L.), 1981–1992. Journal of Apicultural Research 22, pp. 119-125.
- 3) Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, pp. 99–113.
- 4) Finney, D. J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New York.
- 5) Abbott, W. S. (1925). A method for computing the effectiveness of an insecticide. Jour. Econ. Entomol. 18, pp. 265–267.

▼B**C.18. ADSORPTSIOON/DESORPTSIOON, KASUTADES PARTII TASAKAALUSTAMISE MEETODIT****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub OECD juhendist TG 106 mulla adsorptsiooni/desorptsiooni määramiseks, kasutades partii tasakaalustamise meetodit (2000).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev meetod võtab arvesse nii laboritevahelist võrdlust, adsorptsioonikatse tegemise jaoks mulla valikut puudutavat seminari (1, 2, 3, 4) kui ka riiklikul tasandil olemasolevaid juhiseid (5, 6, 7, 8, 9, 10, 11).

Adsorptsiooni-/desorptsiooniuringutest saadakse vajalikku teavet kemikaalide liikuvuse ja jaotumise kohta biosfääri maa-, vee- ja õhukihtides (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21). Seda teavet võib kasutada näiteks selleks, et prognoosida või hinnata kemikaalide lagunemist (22, 23), muundumist või organismide poolt omastamist (24), leostumist läbi mullakihtide (16, 18, 19, 21, 25, 26, 27, 28), lenduvust mullast (21, 29, 30) või uhtumist maapinnalt looduslikku vette (18, 31, 32). Adsorptsiooni puudutavaid andmeid võib kasutada võrdlemiseks ja modelleerimiseks (19, 33, 34, 35).

Kemikaali jagunemine mulla- ja vesifaasi vahel on keeruline protsess, mis sõltub paljudest erinevatest teguritest: aine keemilisest iseloomust (12, 36, 37, 38, 39, 40), mulla omadustest (4, 12, 13, 14, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49) ja kliimateguritest, nagu näiteks sademed, temperatuur, päikesevalgus ja tuul. Seega ei saa kemikaali mullal toimuva adsorptsiooniprotsessiga seotud paljusid erinevaid nähtusi ja mehhanisme täielikult määratleda lihtsustatud laboratoorse mudeli, näiteks käesoleva meetodi abil. Olenemata sellest, et käesoleva meetodiga ei ole võimalik katta kõiki keskkonnas võimalikke juhtusid, annab see siiski väärtuslikku teavet kemikaali adsorptsiooni olulisuse kohta keskkonnale.

Vt ka üldist sissejuhatust.

1.2. REGULEERIMISALA

Selle meetodi eesmärk on kindlaks määrata kemikaalide adsorptsioon/desorptsioon mullas. Eesmärk on saada sorptsiooniväärtus, mida saab kasutada jaotumuse prognoosimiseks erinevates keskkonnatingimustes; selleks määratakse kindlaks kemikaali tasakaalulised adsorptsioonitegurid erinevatele muldadele mullaomaduste funktsioonina (nt orgaanilise süsiniku sisaldus, savisisaldus, mullastruktuur ja pH). Võimalikult laia konkreetse aine ja looduslike muldade vastastikuse mõju hõlmamiseks tuleb kasutada erinevaid mullatüüpe.

Käesolevas meetodis tähendab adsorptsioon kemikaali kinnitumisprotsessi mulla pinnale; selles ei eristata erinevaid adsorptsiooniprotsesse (füüsikaline ja keemiline adsorptsioon) ega selliseid protsesse nagu pindkatalüüseritud lagunemine, koguadsorptsioon või keemiline reaktsioon. Mulla tekitatud kolloidosakestes (läbimõõduga < 0,2 µm) toimunud adsorptsiooni ei võeta arvesse.

▼B

Mullaparaameetrid, mida peetakse adsorptsiooni puhul kõige tähtsamateks, on: orgaanilise süsiniku sisaldus (3, 4, 12, 13, 14, 41, 43, 44, 45, 46, 47, 48), savisisaldus ja mullastruktuur (3, 4, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48) ning pH ioniseerivate ühendite jaoks (3, 4, 42). Muud mulla paraameetrid, mis võivad mõjutada konkreetse aine adsorptsiooni/desorptsiooni, on efektiivne katioonide neelamismahutavus (ECEC), amorfse raua ja alumiiniumoksiidide sisaldus, eriti vulkaaniliste ja troopiliste muldade puhul (4), ja samuti eripindala (49).

Katse eesmärk on määrata kemikaali adsorptsioon erinevates mullatüüpides, millel on erinev orgaanilise süsiniku sisaldus, savisisaldus, mullastruktuur ja pH. See koosneb kolmest tasemest:

1. tase: eelkatse, et teha kindlaks:

- mulla/lahuse suhe;
- adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumise aeg ja adsorbeerunud uuritava aine kogus tasakaaluolekus;
- uuritava aine adsorbeerumine katseanumate pindadel ja uuritava aine püsivus katseperioodi jooksul.

2. tase: sõeluuring: adsorptsiooni uuritakse viie erineva mullatüübi puhul, kasutades adsorptsioonikineetikat ühel kontsentratsioonil ja määrates jaotustegurid K_d ja K_{oc} .

3. tase: Freundlichi adsorptsiooniisotermide määramine, et oleks võimalik määrata kontsentratsiooni mõju mullas toimuva adsorptsiooni ulatusele.

Desorptsiooniuring, kasutades desorptsioonikineetikat/Freundlichi desorptsiooniisotermide (1. liide).

1.3. MÕISTED JA ÜHIKUD

Tähis	Mõiste	Ühikud
A_t	adsorptsiooniprotsent ajahetkel t_i	%
A_{eq}	adsorptsiooniprotsent adsorptsiooni tasakaaluolekus	%
$m_s^{ads}(t_i)$	mullal adsorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel t_i	μg
$m_s^{ads}(\Delta t_i)$	mullal adsorbeerunud uuritava aine mass ajavahemikus Δt_i	μg
$m_s^{ads}(eq)$	mullal adsorbeerunud uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus	μg
m_0	uuritava aine mass katseklaasis adsorptsioonikatse alguses	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	uuritava aine mass, mõõdetud alikvoodis (v_a^A) ajahetkel t_i	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus	μg
m_{soil}	mullafaasi kogus, väljendatud mulla kuivmassina	g

▼ B

Tähis	Mõiste	Ühikud
C_{st}	aine põhilahuse mas sikontsentratsioon	$\mu\text{g cm}^{-3}$
C_0	mullaga kokkupuutuva katselahuse esialgne massikontsentratsioon	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	aine massikontsentratsioon vesifaasis analüüsi tegemise ajahetkel t_i	$\mu\text{g cm}^{-3}$
$C_s^{ads}(eq)$	mullal adsorbeerunud aine sisaldus adsorptsiooni tasakaaluolekus	$\mu\text{g cm}^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	aine massikontsentratsioon vesifaasis adsorptsiooni tasakaaluolekus	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_0	adsorptsioonikatse jooksul mullaga kokkupuutuva vesifaasi esialgne ruumala	cm^3
v_a^A	alivoodi ruumala, milles uuritavat ainet mõõdetakse	cm^3
K_d	adsorptsiooni jaotustegur	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{oc}	orgaanilise süsiniku suhtes normaliseeritud adsorptsioonitegur	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_{om}	orgaanilise ainese suhtes normaliseeritud jaotustegur	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{ads}	Freundlichi adsorptsioonitegur	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$1/n$	Freundlichi eksponent	
D_{t_i}	desorptsiooniprotsent ajahetkel t_i	%
$D_{\Delta t_i}$	desorptsiooniprotsent, mis vastab ajavahele Δt_i	%
K_{des}	ilmne desorptsioonitegur	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$
K_F^{des}	Freundlichi desorptsioonitegur	$\mu\text{g}^{1-1/n} (\text{cm}^3)^{1/n} \text{g}^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	mullast desorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel t_i	μg
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	mullast ajavahele Δt_i desorbeerunud uuritava aine mass	μg
$m_m^{des}(eq)$	aine analüütiliselt määratud mass vesifaasis desorptsiooni tasakaaluolekus	μg
$m_{aq}^{des}(eq)$	desorbeerunud uuritava aine kogumass desorptsiooni tasakaaluolekus	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	aine mass, mis jääb mullale adsorbeerununa pärast ajavahele Δt_i möödumist	μg
m_{aq}^A	osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus	μg
$C_s^{des}(eq)$	mullale jääv adsorbeerunud uuritava aine sisaldus desorptsiooni tasakaaluolekus	$\mu\text{g g}^{-1}$

▼ B

Tähis	Mõiste	Ühikud
C_{aq}^{des} (eq)	uuritava aine massikontsentratsioon vesifaasis desorptsiooni tasakaaluolekus	$\mu\text{g cm}^{-3}$
V_T	desorptsioonikineetika määramisel jadameetodiga mullaga kokku puutuva vesifaasi koguruumala	cm^3
V_R	adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumise järel katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala, mis asendatakse sama ruumala 0,01 M CaCl_2 lahusega	cm^3
V_a^D	desorptsioonikineetika määramisel jadameetodiga analüütilisel eesmärgil ajahetkel (i) võetud alikvoodi ruumala	cm^3
V_{ra}^{iD}	uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist (i) võetud lahuse desorptsioonikineetika ruumala (paralleelmeetod)	cm^3
V_r^F	uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist võetud lahuse ruumala desorptsiooni tasakaaluolekus	cm^3
MB	massitasakaal	%
m_E	mullast ja katseanuma seintelt kahes etapis ekstraheeritud uuritava aine kogumass	μg
V_{rec}	adsorptsiooni tasakaaluoleku järel regenereeritud supernatandi ruumala	cm^3
P_{ow}	jaotustegur oktanool/vesi	
pKa	dissotsiatsioonikonstant	
S_w	lahustuvus vees	g l^{-1}

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Uuritava aine lahuste teadaolevad ruumalad, määramata või radio-määrgistatud, teadaolevate kontsentratsioonidena 0,01 M CaCl_2 -s lisatakse teadaoleva kuivmassiga mullaproovidele, mis on eeltasakaalustatud 0,01 M CaCl_2 -s. Segu segatakse piisava aja jooksul. Seejärel eraldatakse mullasuspensioonid tsentrifuugimise ja soovi korral filtreerimise teel ning analüüsitakse vesifaasi. Mullaproovile adsorbeerunud uuritava aine kogus arvutatakse algselt lahuses esinenud uuritava aine koguse ja katse lõpus järelejäänud uuritava aine koguse vahena (kaudne meetod).

Alternatiivina võib adsorbeerunud uuritava aine koguse määrata ka otse mullaanalüüsi teel (otsene meetod). Menetlust, mis sisaldab mulla astatmist eraldamist sobiva lahustiga, soovitatakse siis, kui aine kontsentratsiooni vahet lahuses ei ole võimalik täpselt määrata. Sellised juhud on näiteks: uuritava aine adsorptsioon katseanuma pinnale, uuritava aine ebastabiilsus katse tegemise jooksul, nõrk adsorptsioon, mis põhjustab lahuses vaid väikese kontsentratsioonimuutuse; ja tugev adsorptsioon, mis põhjustab madala kontsentratsiooni, mida ei ole võimalik täpselt määrata. Radiomäärgistatud aine kasutamisel võib mulla eraldamise ära jätta, kui tehakse mullafaasi analüüs, kasutades põlemist ja vedelikstintillatsiooniloendust. Vedelikstintillatsiooniloendus on siiski mittespetsiifiline tehnika, millelega ei saa teha vahet lähteainetel ja muundatud toodetel, seepärast tuleks seda kasutada ainult siis, kui uuritav aine on püsiv kogu uuringu jooksul.

▼B

1.5. TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

Keemilised reaktiivid peavad olema analüütiliselt puhtad. Soovitatakse kasutada märgistamata uuritavaid aineid, mille koostis on teada ja mille puhtusaste on eelistatavalt vähemalt 95 %, või radio-märgistatud uuritavaid aineid, mille koostis ja radioaktiivsete isotoopide puhtusaste on teada. Kui märgistusainete poolestusaeg on lühike, tuleks kohaldada lagunemise korrigeerimist.

Enne adsorptsiooni-desorptsioonikatse tegemist peab uuritava aine kohta olema kättesaadav järgmine teave:

- a) lahustuvus vees (A.6);
- b) aururõhk (A.4) ja/või Henry konstant;
- c) abiootiline lagunemine: hüdrolüüs pH funktsioonina (C.7);
- d) jaotustegur (A.8);
- e) kiire biolagunduvus (C.4) või aeroobne ja anaeroobne muundumine mullas;
- f) ioniseerivate ainete pKa;
- g) otsene fotolüüs vees (st UV-Vis absorptsioonispekter vees, kvant-saagis) ja fotodegradatsioon mullas.

1.6. KATSE KASUTATAVUS

Katset kasutatakse keemiliste ainete puhul, mille kohta on olemas piisava täpsusega analüüsimeetod. Uuritava aine püsivus katse jooksul on tähtis parameeter, mis võib mõjutada tulemuste usaldatavust, eriti kui kasutatakse kaudset meetodit. Seega tuleb aine püsivust kontrollida eeluuringuga; kui katse tegemise jooksul tuvastatakse muundumine, soovitatakse põhiuuringu tegemiseks kasutada nii mulla- kui ka vesifaasi analüüsi.

Raskused võivad tekkida siis, kui katse tegemisel kasutatakse madala veelahustuvusega uuritavaid aineid ($S_w < 10^{-4} \text{ g l}^{-1}$) või suure laenguga aineid, kuna kontsentratsiooni vesifaasis ei ole võimalik analüütiliselt mõõta piisava täpsusega. Sellisel juhul tuleb võtta lisameetmeid. Juhised selliste probleemide korral käitumiseks esitatakse käesoleva meetodi asjakohastes jagudes.

Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleb hoolitseda selle eest, et uuringu jooksul ei tekiks kadusid.

1.7. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.7.1. Seadmed ja keemilised reaktiivid

Harilik laboratooriumivarustus, eelkõige järgmine.

- a) Katseklaasid või anumad katsete tegemiseks. On oluline, et katseklaasid või anumad:
 - sobiksid vahetult tsentrifuugi, et minimeerida käitlemisest ja ümberpaigutamisest tuleneda võivaid vigu;
 - oleksid tehtud inertsest materjalist, mis muudab uuritava aine adsorbeerumise nende pinnal minimaalseks.

▼B

- b) Raputi: rippraputi või samalaadne seade; raputi peab raputamise ajal hoidma mulda suspensioonis.
- c) Tsentrifuug: eelistatavalt suure kiirusega, nt tsentrifugaaljõuga > 3 000 g, reguleeritava temperatuuriga, võimeline eemaldama vesilahusest osakesi, mille läbimõõt on suurem kui 0,2 µm. Konteinerid peavad raputamise ja tsentrifuugimise jooksul olema suletud, et vältida ainete lenduvust ja veekadu; korkidele tekkiva adsorbeerumise minimeerimiseks tuleb kasutada deaktiveeritud korke, näiteks Teflon®iga kaetud keeratavad korgid.
- d) Pole kohustuslik: filtreerimiseseade; poorsusega 0,2 µm, steriilsed ja ühekordselt kasutatavad filtrid. Eriti tähelepanelikult tuleks valida filtri materjal, et vältida uuritava aine kadu selsesse; nõrgalt lahustuvate uuritavate ainete korral ei soovitata kasutada orgaanilist filtrimaterjali.
- e) Analüüsivahendid, mis sobivad uuritava kemikaali kontsentratsiooni mõõtmiseks.
- f) Laboratooriumiahi, mis on suuteline säilitama temperatuuri 103–110 °C.

1.7.2. **Mulla iseloomustamine ja valik**

Mulda tuleks iseloomustada kolme parameetri abil, mida peetakse enamasti vastutavaks adsorptsioonimahtuvuse eest: orgaaniline süsinik, savisisaldus ja mullastruktuur ning pH. Nagu juba nimetatud (vt „Reguleerimisala”), võivad ka muud mulla füüsikalise-keemilised omadused mõjutada konkreetse aine adsorptsiooni/desorptsiooni ja neid tuleks sellisel juhul arvestada.

Mulla iseloomustamisel on kasutatavad meetodid väga olulised ja need võivad tulemusi märkimisväärselt mõjutada. Seetõttu soovitatakse mulla pH-d mõõta 0,01 M CaCl₂ lahuses (st lahuses, mida kasutatakse adsorptsiooni-/desorptsioonikatses) vastava ISO meetodi (ISO-10390-1) kohaselt. Samuti soovitatakse teised olulised mulla omadused määrata vastavalt standardmeetoditele (nt ISO „Handbook of Soil Analysis”); see võimaldab kasutada sorptsiooniandmete analüüsi, tuginedes ülemaailmselt standarditud mullaparameetritele. Mõned olemasolevate mulla analüüsimeetodite ja iseloomustamise standardmeetodite juhised on esitatud viidetes (50–52). Mulla katsemetodite kalibreerimiseks soovitatakse kasutada võrdlusmulda.

Juhised muldade valimiseks adsorptsiooni-/desorptsioonikatses jaoks esitatakse tabelis 1. Seitse väljavalitud mulda hõlmavad erinevaid parasvöötme mullatüüpe. Ioniseeruvate uuritavate ainete jaoks peavad väljavalitud mullad hõlmama laia pH vahemikku, et oleks võimalik hinnata aine adsorptsiooni ioniseeritud ja ioniseerimata vormides. Juhised selle kohta, mitut erinevat mulda katse erinevates etappides kasutada, on esitatud punktis 1.9 „Katse käik”.

Kui eelistatakse teisi mullatüüpe, tuleks neid iseloomustada samade parameetritega ja neil peaks olema samalaadne omaduste varieeruvus nagu tabelis 1 kirjeldatud tüüpidel, isegi kui need ei vasta täpselt kriteeriumidele.



Tabel 1

Juhised mullaproovide valimiseks adsorptsiooni-desorptsiooni jaoks

Mullatüüp	pH-vahemik (0,01 M CaCl ₂ lahuses)	Orgaanilise süsiniku sisaldus (%)	Savisisaldus (%)	Mulla struktuur ⁽¹⁾
1	4,5–015,5	1,0–2,0	65–80	savi
2	> 7,5	3,5–5,0	20–40	gleistunud saviliiv
3	5,5–7,0	1,5–3,0	15–25	ladestunud saviliiv
4	4,0–5,5	3,0–4,0	15–30	saviliiv
5	< 4,0–6,0 ⁽²⁾	< 0,5–1,5 ⁽²⁾ , ⁽³⁾	< 10–15 ⁽²⁾	saviliivane liiv
6	> 7,0	< 0,5–1,0 ⁽²⁾ , ⁽³⁾	40–65	gleistunud saviliiv/-savi
7	< 4,5	> 10	< 10	liiv/saviliivane liiv

⁽¹⁾ Vastavalt FAO ja US süsteemile (85).

⁽²⁾ Vastavad muutujad peaksid eelistatavalt jääma esitatud vahemikku. Kui sobivat mullamaterjali on siiski raske leida, aktsepteeritakse ka märgitud miinimumist väiksemaid väärtusi.

⁽³⁾ Mullad, mille orgaanilise süsiniku sisaldus on alla 0,3 %, võivad häirida orgaanilise aine sisalduse ja adsorptsiooni vahelist korrelatsiooni. Seetõttu on soovitatav kasutada muldasid, mille minimaalne orgaanilise süsiniku sisaldus on 0,3 %.

1.7.3. Mullaproovide kogumine ja ladustamine
1.7.3.1. Kogumine

Ei soovitata mingeid konkreetseid proovivõtmise tehnikaid ega vahendeid; proovivõtmise tehnika sõltub uuringu eesmärgist (53, 54, 55, 56, 57, 58).

Arvestada tuleks järgmist:

a) vajalik on üksikasjalik teave väliplatsi ajaloo kohta; see sisaldab asukohta, taimkatet, pestitsiidide ja/või väetiste kasutamist, bioloogilisi lisandeid või juhuslikku reostust. Tuleks järgida ISO standardi soovitusi mullaproovide võtmiseks (ISO 10381-6) vastavalt proovivõtmise ala kirjeldusele;

b) proovivõtukohta tuleb määratleda vastavalt UTM-ile (Universal Transversal Mercator-Projection/European Horizontal Datum) või geograafilistele koordinaatidele; see võimaldab tulevikus konkreetset mulda uuesti koguda või aidata määratleda mulda erinevates riikides kasutatavate erinevate klassifitseerimissüsteemide alusel. Samuti tuleks koguda ainult A-kihist kuni 20 cm sügavuselt. Eriti mullatüübi nr 7 korral, kui mullas esineb O_h-kiht, tuleks see lisada proovile.

Mullaproovid tuleks transportida konteinerites ja sellistel temperatuuritingimustel, mis tagavad, et mulla esialgsed omadused märkimisväärselt ei muutu.

▼B1.7.3.2. *Ladustamine*

Eelistatakse mulda, mis on värskest proovivõtualalt võetud. Ainult siis, kui see ei ole võimalik, võib mulda ladustada toatemperatuuril ja seda tuleks hoida õhukuivana. Ladustamisega ei piirata, kuid üle kolme aasta ladustatud mulda tuleks enne kasutamist uuesti analüüsida orgaanilise süsiniku sisalduse, pH ja katioonide neelamismahutavuse (CEC) suhtes.

1.7.3.3. *Mullaproovide käitlemine ja ettevalmistamine uuringuks*

Muld kuivatatakse õhu käes toatemperatuuril (eelistatavalt vahemikus 20–25 °C). Kogused tuleks jaotada võimalikult ettevaatlikult, nii et mulla struktuur muutuks nii vähe kui võimalik. Muld sõelutakse kuni osakeste suuruseni ≤ 2 mm; sõelumisprotsessi puhul tuleks järgida ISO standardi soovitusi mullaproovide võtmiseks (ISO 10381-6). Soovitatakse hoolikat homogeneenimist, sest see suurendab tulemuste reprodutseeritavust. Iga mulla niiskusesisaldus määratakse kindlaks kolme alikvoodiga, mida kuumutatakse temperatuuril 105 °C, kuni märgatavat massimuutust enam ei esine (ligikaudu 12 tundi). Kõikide arvutuste puhul tähendab mulla mass ahjukuiva massi, st mulla massi, mis on korrigeeritud niiskusesisaldusega.

1.7.4. **Uuritava aine mullale lisamiseks ettevalmistamine**

Uuritav aine lahustatakse 0,01 M CaCl₂ destilleeritud või deioniseeritud vee lahuses; CaCl₂ lahust kasutatakse kui vesilahuse faasi, et parandada tsentrifuugimist ja minimeerida katioonide neelamist. Põhilahuse kontsentratsioon peaks eelistatavalt olema kolm suurusjärku kõrgem kui kasutatava analüüsimeetodi avastamispiir. See lävi kaitseb mõõtmise täpsust vastavalt käesolevas meetodis kasutatavale metoodikale; lisaks sellele peaks põhilahuse kontsentratsioon olema allpool uuritava aine lahustuvuse piiri vees.

Põhilahus tuleks eelistatavalt ette valmistada vahetult enne selle lisamist mullaproovidele ja seda tuleks hoida suletuna pimedas temperatuuril 4 °C. Hoiuaeg sõltub uuritava aine püsivusest ja selle kontsentratsioonist lahuses.

Ainult halvasti lahustuvate ainete puhul ($S_w < 10^{-4}$ g l⁻¹) võib osutada vajalikuks kasutada sobivat solubiliseerivat ainet, kui uuritavat ainet on raske lahustada. See solubiliseeriv aine: a) peaks segunema veega, nagu näiteks metanool või atsetonitriil; b) selle kontsentratsioon ei tohiks ületada 1 % põhilahuse koguruumalast ja peaks moodustama alla selle määra uuritava aine lahuses, mis puutub kokku mullaga (eelistatavalt alla 0,1 %); ja c) ei tohiks olla pindaktiivne aine ega osaleda solvolüüsis uuritavate kemikaalidega. Solubiliseeriva aine kasutamine tuleks sätestada ja uuringuaruandes ära põhjendada.

Teine võimalus halvasti lahustuvate ainete jaoks on uuritava aine lisamine uuritavasse süsteemi süstitavate portsjonite kaupa: uuritav aine lahustatakse orgaanilises lahustis, selle alikvoot lisatakse mullast ja 0,01 M CaCl₂ lahusest destilleeritud või deioniseeritud veest koosnevasse süsteemi. Orgaanilise lahusti sisaldus vesifaasis tuleks hoida võimalikult madalal, tavaliselt mitte üle 0,1 %. Spaikimine orgaanilisest lahusest võib mõjutada negatiivselt mahu reprodutseeritavust. Seega on võimalik täiendava vea esinemine, kui uuritava aine ja kaaslahusti kontsentratsioonid ei ole samad kõikides katsetes.

▼B

1.8. ADSORPTSIOONI-/DESORPTSIOONIKATSE TEGEMISE EELDUSED'

1.8.1. **Analüüsimeetod**

Kõige tähtsamad parameetrid, mis võivad mõjutada sorptsiooni määramise täpsust, on nii lahuse-kui adsorptsioonifaaside analüüsimisel kasutatava analüüsimeetodi täpsus, uuritava aine püsivus ja puhtus, sorptsiooni tasakaaluoleku püstitumine, lahuse kontsentratsioonimuutuse suurus, mulla/lahuse suhe ja muutused mulla struktuuris tasakaaluprotsessi jooksul (35, 59–62). 2. liites esitatakse mõningad näited täpsust puudutavate küsimuste kohta.

Kasutatud analüüsimeetodi usaldusväärsust tuleb kontrollida sellises kontsentratsioonivahemikus, mis võib tõenäoliselt esineda uuringu käigus. Uuringu läbiviija võib vabalt välja töötada sobiva meetodi koos asjakohase täpsuse, kordustäpsuse, reprodutseeritavuse, avastamispiiride ja regenereeritavusega. Juhised sellise uuringu tegemiseks antakse allpool kirjeldatud katsega.

Sobiv ruumala 0,01 M CaCl₂ lahust, nt 100 cm³, segatakse 4 tunni jooksul mulla kogusega (nt 20 g), mille adsorptsioonivõime on kõrge, st millel on kõrge süsiniku- ja savisisaldus; need kogused ja ruumalad võivad varieeruda sõltuvalt analüüsi tingimustest, kuid alguspunktiks on sobiv mulla/lahuse suhe 1:5. Segu tsentrifuugitakse ja vesifaasi võib filtreerida. Viimasele lisatakse teatav ruumala uuritava aine põhilahust, et saavutada nominaalne kontsentratsioon selles kontsentratsioonivahemikus, mis võib katse käigus tõenäoliselt esineda. See ruumala ei tohiks olla suurem kui 10 % vesifaasi lõpliku ruumalast, et võimalikult vähem muuta tasakaaluolekueelse lahuse omadusi. Lahust analüüsitakse.

Tuleb teha ka üks pimekatse ainult mulla ja CaCl₂ lahusega (ilma uuritava aineta), et oleks võimalik kontrollida analüüsimeetodist tulenevaid artefakte ja pinnasest põhjustatud matriksefekte.

Analüüsimeetodid, mida võib kasutada sorptsiooni määramiseks, on gaasikromatograafia (GLC), kõrgsurvedelikkromatograafia (HPLC), spektrometria (nt GC/massispektrometria, HPLC/massispektrometria) ja vedeliktsintillatsiooniloendus (radio-märgistatud ainete puhul). Kasutatavast analüüsimeetodist sõltumata loetakse sobivaks, kui taastumine jääb vahemikku 90–110 % nominaalväärtusest. Selleks, et võimaldada pärast jaotamist tulemust kindlaks määrata ja hinnata, peavad analüüsimeetodi avastamispiirid olema vähemalt kaks suurusjärku allpool nominaalset kontsentratsiooni.

Adsorptsiooniuuringute tegemisel kasutatava analüüsimeetodi omadustel ja avastamispiiridel on katsetingimuste kindlaksmääramisel oluline roll ja need mõjutavad kogu katse tulemusi. Kõnealuse meetodiga järgitakse üldiseid katsete tegemise reegleid ja sellega antakse soovitusid ning juhtnöörid alternatiivsete lahenduste jaoks, kui analüüsimeetod ja laboratoorsed võimalused jäävad kitsaks.

▼ B

1.8.2. Optimaalsete mulla/lahuse suhete valimine

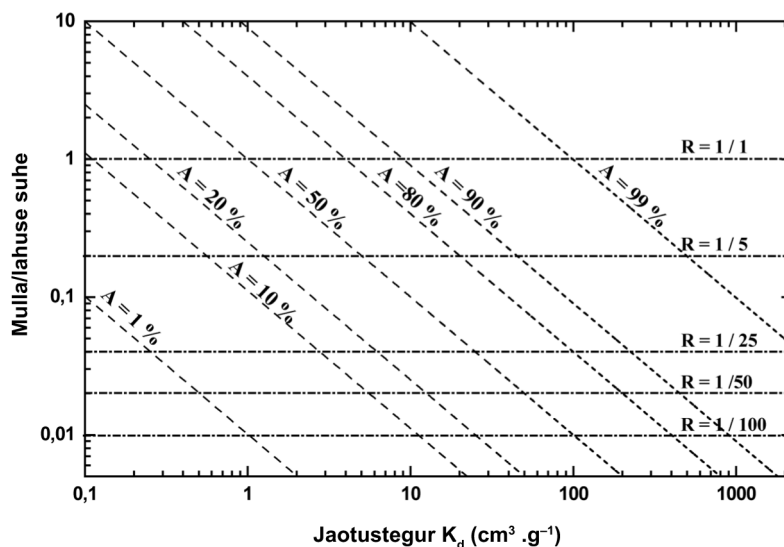
Sobivate mulla/lahuse suhete valik sorptsiooniuringute jaoks sõltub jaotustegurist K_d ja soovitatavast suhtelisest adsorptsioonimäärast. Aine kontsentratsiooni muutus lahuses määrab ära adsorptsiooni võrrandil põhinevate määramiste statistilise täpsuse ja analüüsimeetodi piiri kemikaali kindlaksmääramisel lahuses. Seetõttu on üldises praktikas kasulik keskenduda mõnele fikseeritud suhtele, mille puhul adsorbeerumise protsent on üle 20 % ja soovitatavalt > 50 % (62), hoolitsedes samal ajal selle eest, et uuritava aine kontsentratsioon vesifaasis oleks selle täpselt määramiseks piisavalt kõrge. See on eriti oluline siis, kui adsorptsiooniprotsent on kõrge.

Ostatabekas lähenemine sobivate mulla/vee suhete valimiseks põhineb K_d väärtuse hindamisel kas eeluuringute käigus või kindlaksmääratud hindamistehnikate abil (3. lüde). Seega võib sobiva suhte valimine põhineda K_d funktsioonina esitatud mulla/lahuse suhte graafiku põhjal fikseeritud adsorptsiooniprotsentidel (joonis 1). Selles graafikus eeldatakse, et adsorptsioonivõrrand on lineaarne.⁽¹⁾ Kasutatav sõltuvus saadakse K_d avaldise (4) teisendamisel võrrandi (1) vormi:

$$\frac{V_0}{m_{\text{soil}}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (1)$$

Või selle logaritmilise vormi eeldades, et $R = m_{\text{soil}}/V_0$ ja $A_{\text{eq}} \% / 100 = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0}$.

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{\text{eq}} \% / 100)}{(1 - A_{\text{eq}} \% / 100)} \right] \quad (2)$$



Joonis 1. Mulla/lahuse suhete ja K_d vaheline suhe uuritava aine erinevate adsorptsiooniprotsentide juures.

⁽¹⁾ $C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$

▼B

Joonisel 1 esitatakse vajalikud mulla/lahuse suhted K_d funktsioonina erinevate adsorptsiooniastmete jaoks. Näiteks kui mulla/lahuse suhe on 1:5 ja K_d on 20, esineb ligikaudu 80 %ne adsorptsioon. Selleks, et sama K_d korral saada 50 %st adsorptsiooni, tuleb kasutada suhet 1:25. Käesolev lähenemisviis sobivate mulla/lahuse suhete valimiseks võimaldab uurijal paindlikult eksperimendi vajadustega arvestada.

Raskemini käsitletavad olukorrad on sellised, kus kemikaali adsorptsioon on väga tugev või nõrk. Madala adsorptsiooni korral on soovitatav kasutada mulla ja lahuse vahekorda 1:1, kuigi mõnede väga orgaanilist tüüpi muldade puhul võib suspensiooni saamiseks osutada vajalikuks väiksem suhe. Lahuses väikeste kontsentratsioonimuutuste määramiseks kasutatava analüüsimeetodi korral tuleb olla ettevaatlik, vastasel korral võib adsorptsiooni määramine olla ebatäpne. Teisest küljest, kui jaotustegurid K_d on väga kõrged, võib mulla/lahuse suhe tõusta kuni 1:100, et lahusesse jääks märkimisväärne kogus kemikaali. Siiski tuleb hoolitseda korraliku segamise eest ning süsteemile tuleb tasakaalu püstitamiseks anda piisavalt aega. Alternatiivseks lähenemiseks selliste ekstreemsete juhtudega tegelemisel, kui sobiv analüüsimeetod puudub, on prognoosida K_d väärtus, kasutades selliseid hindamistehnikaid, mis põhinevad näiteks P_{ow} väärtustel (3. liide). See võiks olla eriti kasulik nõrgalt adsorbeeruvate/polaarsete kemikaalide korral, mille $P_{ow} < 20$, ja lipofiilsete/väga sorbeeruvate kemikaalide korral, mille $P_{ow} > 104$.

1.9. KATSE KÄIK

1.9.1. Katsetingimused

Kõik katsed tehakse toatemperatuuril ja võimaluse korral konstantse temperatuuri juures, mis jääb vahemikku 20–25 °C.

Tsentrifugimisega peaks olema võimalik eraldada lahusest suuremad kui 0,2 µm suurused osakesed. Selle väärtusega tähistatakse väikseimat tahke osakese suurust ja see on piirväärtuseks tahkete ja kolloidosakeste vahel. Tsentrifugimise tingimuste kindlaksmääramise juhised esitatakse 4. liites.

Kui tsentrifugimisega ei ole võimalik tagada suuremate kui 0,2 µm suuruste osakeste eraldamist, tuleks kasutada tsentrifugimise ja 0,2 µm suurusega filtreid kasutava filtreerimise kombinatsiooni. Need filtrid peaksid olema tehtud sobivast inertsest materjalist, et vältida uuritava aine kadu nendes. Igal juhul tuleks tõestada, et filtreerimise jooksul ei esine uuritava aine kadu.

1.9.2. 1. tase – eeluring

Eeluringu eesmärk on esitatud jaos „Reguleerimisala”. Juhised sellise uuringu ettevalmistamiseks esitatakse allpool kirjeldatud katsega.

1.9.2.1. Optimaalsete mulla/lahuse suhete valimine

Kasutatakse kahte mullatüüpi ja kolme mulla/lahuse suhet (kuus katset). Ühel mullatüübil on kõrge orgaanilise süsiniku sisaldus ja madal savisisaldus ning teisel on madal orgaanilise süsiniku sisaldus ja kõrge savisisaldus. Soovitatakse järgmisi mulla/lahuse suhteid:

— 50 g mulda ja 50 cm³ uuritava aine vesilahust (suhe 1/1);

▼B

— 10 g mulda ja 50 cm³ uuritava aine vesilahust (suhe 1/5);

— 2 g mulda ja 50 cm³ uuritava aine vesilahust (suhe 1/25).

Minimaalne mulla kogus, mida võib katses kasutada, sõltub laboratooriumi võimalustest ja kasutatavate analüüsimeetodite võimelisusest. Siiski soovitatakse kasutada vähemalt 1 g ja eelistatavalt 2 g, et uuringu tulemused oleksid usaldusväärsed.

Ühte kontrollproovi, milles on ainult uuritav aine 0,01 M CaCl₂ lahuses (ilma mullata), käideldakse täpselt samamoodi kui katsesüsteemigi, et kontrollida uuritava aine püsivust CaCl₂ lahuses ja selle võimalikku adsorptsiooni katseanumate seintele.

Ühele pimekatsele sama koguse mullaga ja lahuse koguruumalaga 50 cm³ 0,01 M CaCl₂ (ilma uuritava aineta) tehakse sama menetlus. See toimib taustkontrollina analüüsides jooksul, et avastada häirivad ained või saastunud mullad.

Kõiki katseid, sealhulgas kontrollid ja pimekatsed, tuleks teha vähemalt kaks korda. Uuringu jaoks ettevalmistatavate proovide koguarvu võib arvutada vastavalt kasutatavale meetodikale.

Eeluuringu ja põhiuuringu meetodid on üldiselt samad, erandid on vajaduse korral mainitud.

Õhu käes kuivatatud mullaproovid tasakaalustatakse, raputades neid koos minimaalselt 45 cm³ 0,01 M CaCl₂ lahusega terve öö (12 tundi) enne katse tegemise päeva. Hiljem lisatakse teatav kogus uuritava aine põhilahust, et saada lõplikuks mahuks 50 cm. Lisatava põhilahuse maht a) ei tohiks ületada 10 % vesifaasi lõplikust 50 cm³ suurusest mahust, et tasakaalustamiseelse lahuse omadused muutuksid võimalikult vähe, ja b) peaks olema eelistatavalt selline, et mullaga kokku puutuva uuritava aine esialgne kontsentratsioon (C₀) on analüüsimeetodi avastamispiiriga võrreldes vähemalt kaks suurusjärku kõrgem; see lävi võimaldab mõõtmisi täpselt teha isegi tugeva adsorptsiooni esinemise korral (> 90 %) ja hiljem määratleda adsorptsiooniisotermid. Samuti soovitatakse võimaluse korral, et aine esialgne kontsentratsioon (C₀) ei oleks suurem kui pool selle lahustuvuse piirist.

Allpool esitatakse näide põhilahuse kontsentratsiooni (C_{st}) arvutamise kohta. Eeldatakse, et avastamispiir on 0,01 µg cm⁻³ ja adsorptsioon 90 %; seega peaks mullaga kokkupuutuva uuritava aine esialgne kontsentratsioon olema eelistatavalt 1 µg cm⁻³ (kaks suurusjärku kõrgem kui analüüsimeetodi avastamispiir). Eeldades, et lisatakse maksimaalne soovitatud põhilahuse ruumala, st 5–45 cm³ 0,01 M CaCl₂ tasakaalulahust (= 10 % põhilahust vesifaasi 50 cm³ kogumahust), millega põhilahuse kontsentratsioon peaks olema 10 µg cm⁻³; see on kolm suurusjärku kõrgem kui analüüsimeetodi avastamispiir.

Vesifaasi pH tuleks mõõta enne ja pärast mullaga kokkupuutumist, kuna sellel on tähtis osa kogu adsorptsiooniprotsessis, eriti ioniseerivate ainete korral.

▼B

Segu raputatakse adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseni. Tasakaaluoleku püstitumise aeg muldade lõikes erineb suuresti sõltuvalt kemikaalist ja mullast; tavaliselt piisab 24 tunnist (77). Eeluurings võib proovid koguda järjest 48tunnise segamisperioodi jooksul (näiteks 4., 8., 24. ja 48. tunnil). Siiski tuleks analüüsiajad määrata paindlikult, et võtta arvesse laboratooriumi töögraafikut.

Uuritava aine analüüsimiseks vesilahuses on kaks võimalust: a) paralleelmeetod ja b) jadameetod. Tuleks rõhutada, et kuigi paralleelmeetod on eksperimentaalselt töömahukam, on tulemuste matemaatiline töötlemine lihtsam (5. liide). Siiski jäetakse kasutatava meetodi valik katse läbiviijale, kes peab arvestama kasutatava laboratooriumi võimalusi ja ressursse.

a) Paralleelmeetod: valmistatakse ette nii palju sama mulla/lahuse suhtega proove, kui mitmes ajavahemikus soovitakse adsorptsioonikineetikat uurida. Pärast tsentrifuugimist ja soovi korral pärast filtreerimist regenereeritakse esimese katseklaasi vesifaas võimalikult täielikult ja mõõdetakse nt 4 tunni pärast, vastav teise katseklaasi oma pärast 8. tundi, kolmanda oma pärast 24. tundi jne.

b) Jadameetod: iga mulla/lahuse suhte kohta valmistatakse ette ainult üks kordusproov. Kindlaksmääratud ajavahemike vahel tsentrifuugitakse segu faaside eraldamiseks. Vesifaasist võetakse väike alikvoot, milles kohe analüüsitakse uuritavat ainet; seejärel jätkub katse esialgse seguga. Kui pärast tsentrifuugimist kasutatakse filtreerimist, peavad laboratooriumil olema vahendid väikeste vesialikvootide filtreerimiseks. On soovitatav, et võetud alikvootide koguruumala ei ületaks 1 % lahuse koguruumalast, et mulla/lahuse suhe ei muutuks märkimisväärselt ning adsorptsiooniks olemasoleva soluudi mass ei väheneks uuringu kestel.

Adsorptsiooniprotsent A_t arvutatakse igal ajahetkel (t_i) nominaalse esialgse kontsentratsiooni alusel ja proovivõtmise hetkel (t_i) mõõdetud kontsentratsiooni korrigeeritakse vastavalt pimekatse A_t väärtusele. Tasakaaluolekule vastava platoo määramiseks koostatakse graafikud teljestikus aeg (5. liites joonis 1)⁽¹⁾. Samuti arvutatakse välja K_d väärtus tasakaaluolekus. Selle K_d väärtuse põhjal valitakse jooniselt 1 välja sobivad mulla/lahuse suhted nii, et adsorptsiooniprotsent on üle 20 % ja eelistatavalt > 50 % (61). Kõik graafikutes kasutatavad võrrandid ja põhimõtted on esitatud punktis „Andmed ja aruandlus” ning 5. liites.

1.9.2.2. *Adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumise aja ja tasakaaluolekus adsorbeerunud uuritava aine koguse määramine*

Nii nagu juba mainitud, võimaldavad graafikud teljestikus A_t or C_{aq}^{ads} – aeg hinnata adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumist ja adsorbeerunud uuritava aine kogust selles. 5. liites esitatud joonised 1 ja 2 on selliste graafikute näidisteks. Tasakaaluoleku püstitumise aeg on see aeg, mida süsteem vajab tasakaaluolekule vastava platoo saavutamiseks.

⁽¹⁾ Tasakaaluolekule vastava platoo püstitumise hindamiseks võib kasutada ka graafikuid, mis kirjeldavad vesifaasis oleva uuritava aine kontsentratsiooni C_{aq}^{ads} ja aja suhet (vt 5. lisa joonist 2).

▼B

Kui mõne konkreetse mulla puhul saavutatakse tasakaaluolekule vastava platoo asemel pidev kontsentratsiooni tõus, võib see olla tingitud segavatest teguritest, nagu näiteks biolagundamine või aeglane hajumine. Biolagundamist võib näidata, korrates katset steriliseeritud mullaprooviga. Kui tasakaaluolekule vastavat platood ei saavutata ka selle prooviga, peaks katse läbiviija otsima muid nähtusi, mis võiksid olla seotud antud uuringuga; seda võib teha asjakohaste katsetingimuste muutmisega (temperatuur, raputamise ajad, mulla/lahuse suhted). Jätakse katse tegija otsustada, kas jätkata uuringut, kuigi tasakaaluolek võib jääda püstitumata.

1.9.2.3. *Adsorptsioon katseanuma pinnal ja uuritava aine püsivus*

Mõningat teavet uuritava aine adsorptsiooni kohta katseanuma pinnal ning püsivuse kohta on võimalik tuletada kontrollproove analüüsides. Kui tuvastatakse kontsentratsiooni kahanemine, mis ületab analüüsimetodi standardvea, võib olla tegu abiootilise lagunemise ja/või adsorptsiooniga katseanuma pinnale. Neid kahte nähtust on võimalik eristada nii, et anuma seinad pestakse põhjalikult sobiva lahusti teadaoleva ruumalaga ja pesemislahuses analüüsitakse uuritava aine kogust. Kui adsorptsiooni katseanuma pinnal ei täheldata, tähistab kontsentratsiooni vähenemine abiootilist ebastabiilsust. Kui tuvastatakse adsorptsioon, tuleb katseanuma materjal ära vahetada. Siiski ei või käesoleva katsega katseanuma pinnale adsorbeerumise kohta saadud teavet otse ekstrapoleerida mulla/lahuse katsele. Mulla olemasolu mõjutab seda adsorptsiooni.

Lisateavet uuritava aine püsivuse kohta on võimalik tuletada, määrates esialgse massitasakaalu aja jooksul. See tähendab, et uuritav aine määratakse vesifaasis, mullaproovides ja katseanuma seintel. Lisatud uuritava kemikaali massi ja vesifaasis oleva uuritava kemikaali masside ja mullast ning katseanuma seintel saadud ekstraktide summa vaheline erinevus on võrdne alanenud ja/või lendunud ja/või mitteekstraheerunud massiga. Massitasakaalu määramiseks peab adsorptsiooni tasakaaluolek püstituma katse tegemise aja jooksul.

Massitasakaal määratakse mõlema mulla ning ka iga mulla korral ühe muld/lahus suhte jaoks, mille korral on vaesustumine suurem kui 20 % ning eelistatavalt > 50 % tasakaaluolekuga võrreldes. Kui suhte leidmise katse lõpetatakse koos vesifaasist 48 tunni pärast võetud proovi analüüsimisega, eraldatakse faasid tsentrifuugimisega ja soovi korral filtreerides. Vesifaas regenereeritakse niipalju kui võimalik ja mullale lisatakse sobivat ekstrahanti (ekstraktsiooniteguriga vähemalt 95 %), et uuritavat ainet ekstraheerida. Soovitatakse vähemalt kahte järjestikust ekstraheerimist. Määratakse uuritava aine kogus mullas ja katseanuma ekstraktides ja arvutatakse massitasakaal (võrrand 10, „Andmed ja aruandlus”). Kui see on alla 90 %, käsitatakse uuritavat ainet ebapüsivana uuringuks kuluva aja jooksul. Siiski võib uuringut jätkata, võttes arvesse uuritava aine ebapüsivust; sellisel juhul soovitatakse põhiuuringus analüüsida mõlemat faasi.

▼B

1.9.2.4. 2. tase – adsorptsioonikineetika ühel uuritava aine kontsentratsioonil

Kasutatakse viit mulda, mis on valitud tabelist 1. Nende viie mulla hulka on soovitatav lisada võimaluse korral mõned või kõik eeluringus kasutatud mullad. Sellisel juhul ei tule 2. taset korrata eeluringus kasutatud muldade puhul.

Tasakaalu saavutamise aeg, mulla/lahuse suhe, mullaproovi mass, mullaga kokkupuutuva vesifaasi ruumala ja uuritava aine kontsentratsioon lahuses valitakse vastavalt eeluringu tulemustele. Analüüs tuleks teha eelistatavalt siis, kui kokkupuutest on möödunud ligikaudu 2, 4, 6, 8 (võimaluse korral ka 10) ja 24 tundi; raputamise aega võib pikendada maksimaalselt 48 tunnini juhul, kui kemikaal tasakaalu saavutamiseks suhte leidmise tulemuste alusel on vaja rohkem aega. Siiski võib analüüsiaegadesse suhtuda paindlikult.

Iga katse (üks muld ja üks lahus) tehakse vähemalt kask korda, et määrata kindlaks tulemuste varieerumine. Iga katse kohta tehakse üks pimekatse. See koosneb mullast ja 0,01 M CaCl₂ lahusest ilma uuritava aineta ning selle mass ja ruumala peavad olema katses kasutatavatega identsed. Kontrollproovile, milles on ainult uuritava aine 0,01 M CaCl₂ lahuses (ilma mullata), tehakse sama menetlus, et pakkuda kaitset ootamatuste vastu.

Adsorptsiooniprotsent arvutatakse igal A_t ja/või $A_{\Delta t}$ (vastavalt vajadusele) ja esitatakse graafiliselt ajateljel. Arvutatakse ka jaotustegur K_d tasakaaluolekus ning orgaanilise süsiniku suhtes normaliseeritud adsorptsioonitegur K_{oc} (mittepolaarsete orgaaniliste kemikaalide puhul).

Adsorptsioonikineetika uuringu tulemused

Lineaarne K_d väärtus on üldiselt täpne sorptsioonilise käitumise kirjeldamiseks mullas (35, 78) ja väljendab kemikaalide loomulikku liikuvust mullas. Näiteks kemikaale, mille $K_d \leq 1 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$, peetakse üldiselt kergesti liikuvateks. Sarnaselt on MacCall *et al.* (16) välja töötanud K_{oc} väärtustel põhineva liikuvuse klassifikatsiooniskeemi. Lisaks on olemas leostumise klassifikatsiooniskeemid, mis põhinevad K_{oc} ja DT-50 suhtel (¹⁾ (32, 79).

Vastavalt veaanalüüsi uuringutele (61) ei ole samuti võimalik täpselt määrata K_d väärtusi, mis on alla $0,3 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ vesifaasi vähenenud kontsentratsiooni alusel, isegi siis, kui kasutatakse kõige soovitatavamad (täpsuse seisukohast) mulla/lahuse suhet, st 1:1. Sellisel juhul soovitatakse analüüsida nii mulla kui ka lahuse faasi.

(¹) DT-50: aeg, mille jooksul 50 % uuritavast ainest on hajunud.

▼B

Seoses eelnevate märkustega soovitatakse kemikaali adsorptsioonilist käitumist ja selle võimalikku liikuvust mullas käsitlevat uuringut jätkata, määrates nendes süsteemides Freundlichi adsorptsiooniisotermid, mille jaoks on võimalik K_d täpselt määrata, kasutades käesolevas katsemeetodis järgitud katseprotokolli. Täpne määramine on võimalik, kui K_d ja mulla/lahuse suhte korrutis on $> 0,3$, siis kui määramine põhineb kontsentratsiooni langusele vesifaasil (kaudne meetod), või $> 0,1$, siis kui analüüsitakse mõlemat faasi (otsene meetod) (61).

1.9.2.5. 3. tase – adsorptsiooniisotermid ja desorptsioonikineetika/desorptsiooniisotermid

1.9.2.5.1. Adsorptsiooniisotermid

Kasutatakse viit uuritava aine kontsentratsiooni, mis hõlmavad soovitatavalt kahte suurusjärku; nende kontsentratsioonide valimisel tuleks võtta arvesse lahustuvust vees ja sellest tulenevaid vesilahuse tasakaalukontsentratsioone. Iga mulla kohta tuleks säilitada sama mulla/lahuse suhe kogu uuringu jooksul. Adsorptsioonikatse tehakse vastavalt eespool kirjeldatule, välja arvatud see, et vesifaasi analüüsitakse ainult üks kord ajahetkel, mil on vaja saavutada tasakaal, nagu on määratletud eespool 2. taseme juures. Määratakse lahuse tasakaalukontsentratsioonid ja arvutatakse adsorbeerunud kogus uuritava aine vähenemise alusel lahuses või otsese meetodi abil. Adsorbeerunud mass mulla ühikumassi kohta esitatakse uuritava aine tasakaalukontsentratsiooni funktsioonina (vt „Andmed ja aruandlus”).

Adsorptsiooniisotermide katse tulemused

Siiani esitatud matemaatilistest adsorptsioonimudelitest on Freundlichi isoterm üks kõige sagedamini kasutatav adsorptsiooniprotsessi kirjeldamise mudel. Üksikasjalikum teave adsorptsioonimudelite tõlgendamise ja olulisuse kohta on esitatud viidetes (41, 45, 80, 81, 82).

Märkus. Tuleb märkida, et erinevate ainete K_F väärtuste (Freundlichi adsorptsioonitegur) võrdlemine on võimalik ainult siis, kui need K_F väärtused on väljendatud samades ühikutes (83).

1.9.2.5.2. Desorptsioonikineetika

Käesoleva katse eesmärk on uurida, kas kemikaal on mullal adsorbeerunud pöördvalt või mittepöördvalt. See teave on oluline, sest desorptsiooniprotsessil on samuti tähtis osa kemikaali käitumises välitingimustes asuvas mullas. Lisaks on desorptsioonandmed kasulikuks sisendiks leostumist kirjeldava arvutiga modelleerimise puhul ja lahustunud aineid sisaldava äravoolusimulatsiooni korral. Desorptsiooniuuringu puhul soovitatakse allpool kirjeldatud uuring teha iga süsteemi kohta, mille kohta oli eelneva adsorptsioonikineetika katse käigus võimalik määrata täpne K_d .

Nagu adsorptsioonikineetika katse puhul, on ka desorptsioonikineetika katse tegemiseks kaks võimalust: a) paralleelmeetod ja b) jada-meetod. Kasutatava meetodi valik jäetakse katse tegijale, kes peab arvestama kasutatava laboratooriumi võimalusi ja ressursse.

▼B

- a) Paralleelmeetod: iga mulla kohta, mis valitakse desorptsiooniuringu tegemiseks, valmistatakse ette sama mulla/lahuse suhtega nii palju proove, kui mitmes ajavahemikus soovitakse desorptsioonikineetikat uurida. Eelistatavalt tuleks kasutada samasid ajavahemikke, mida kasutati adsorptsioonikineetika katses; siiski võib kogu aeg vajaduse korral pikeneda, et süsteem jõuaks desorptsiooni tasakaaluoleku püstitamiseni. Iga katse (üks muld, üks lahus) korral tehakse üks pimekatse. See koosneb mullast ja 0,01 M CaCl_2 lahusest ilma uuritava aineta ja selle mass ja ruumala peavad olema identsed katses kasutatavatega. Kontrollproovile, milles on uuritav aine 0,01 M CaCl_2 lahuses (ilma mullata), tehakse sama menetlus. Kõiki mulla ja lahuse segusid raputatakse kuni adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseni (nagu on määratletud eespool 2. taseme juures). Seejärel eraldatakse faasid tsentrifuugimise teel ja vesifaas kõrvaldatakse nii suures ulatuses kui võimalik. Kõrvaldatud lahuse ruumala asendatakse sama ruumala 0,01 M CaCl_2 lahusega, milles ei ole uuritavat proovi, ja uusi segusid raputatakse uuesti. Esimese katseklaasi vesifaas regenereeritakse nii täielikult kui võimalik ja mõõdetakse hiljem, nt 2 tunni pärast, vastav teise katseklaasi oma pärast 4. tundi, kolmanda oma pärast 6. tundi jne, kuni desorptsiooni tasakaaluolek on püstitunud.
- b) Jadameetod: pärast adsorptsioonikineetika katset tsentrifuugitakse segu ja vesifaas kõrvaldatakse nii suures ulatuses kui võimalik. Kõrvaldatud lahuse ruumala asendatakse sama ruumala 0,01 M CaCl_2 lahusega, milles ei ole uuritavat ainet. Uut segu raputatakse desorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseni. Selle aja jooksul tsentrifuugitakse segu kindlaksmääratud ajavahemike järel faaside eraldamiseks. Vesifaasist võetakse väike alikvoot, milles kohe analüüsitakse uuritavat ainet; seejärel jätkub katse esialgse seguga. Iga individuaalse alikvoodi ruumala peaks olema kogumahust alla 1 %. Segule lisatakse sama ruumala värsket 0,01 M CaCl_2 lahust mulla/lahuse suhte säilitamiseks ja raputamine jätkub järgmise ajavahemikuni.

Desorptsiooniprotsent arvutatakse igal ajahetkel (D_t) ja/või ajavahemikul (D_t) (vastavalt uuringu vajadustele) ja esitatakse graafiliselt ajateljel. Samuti arvutatakse K_{des} desorptsioonitegur tasakaaluolekus. Kõik kasutatavad võrrandid on esitatud punktis „Andmed ja aruandlus” ja 5. liites.

Desorptsioonikineetika katse tulemused

Teljestikus desorptsiooniprotsent (D_t) ja adsorptsiooniprotsendi A_t – aeg koostatud graafikute abil on võimalik hinnata adsorptsiooniprotsessi pööratavust. Isegi kui desorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseks kulub kaks korda rohkem aega kui adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseks ja kogu desorptsioon on üle 75 % adsorbeerunud kogusest, loetakse adsorptsiooni pöörduvaks.

1.9.2.5.3. Desorptsiooniisotermid

Freundlichi desorptsiooniisotermid määratakse muldades, mida on kasutatud adsorptsiooniisotermide katses. Desorptsioonikatse tehakse punktis „Desorptsioonikineetika” kirjeldatud viisil, välja arvatud see, et vesifaasi analüüsitakse ainult üks kord desorptsiooni tasakaaluolekus. Arvutatakse desorbeerunud uuritava aine kogus. Mullale jääv adsorbeerunud uuritava aine kogus desorptsiooni tasakaaluolekus esitatakse uuritava aine tasakaalukontsentratsiooni funktsioonina lahuses (vt „Andmed ja aruandlus” ja 5. liidet).

▼ B**2. ANDMED JA ARUANDLUS**

Analüüsi andmed esitatakse tabelina (vt 6. liidet). Esitatakse individuaalsed mõõtmised ja arvutatud keskmised. Adsorptsiooniisotermid esitatakse graafiliselt. Arvutused tehakse allpool kirjeldatud viisil.

Uuringu tegemisel arvestatakse, et 1 cm³ vesilahuse mass on 1 g. Mulla/lahuse suhet võib väljendada nii massiprotsendi (w/w) kui ka mahuprotsendi (w/vol) ühikutes sama arvu abil.

2.1. ADSORPTSIOON

Adsorptsiooni A_{t_i} määratletakse kui mullal adsorbeerunud aine protsenti katse alguses olemasolevast kogusest vastavalt katsetingimustele. Kui uuritav aine on püsiv ega adsorbeeru märkimisväärselt anuma seinal, arvutatakse A_{t_i} igal ajahetkel t_i vastavalt järgmisele võrrandile:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (3)$$

kus:

A_{t_i} = adsorptsiooniprotsent ajahetkel t_i (%);

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = mullal adsorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel t_i (µg);

m_0 = uuritava aine mass katseklaasis katse alguses (µg).

Üksikasjalik teave adsorptsiooniprotsendi A_{t_i} arvutamise kohta paralleel- ja jadameetodite kasutamise korral on esitatud 5. liites.

Jaotustegur K_d on mullafaasis oleva aine sisalduse ja vesifaasis oleva aine massikontsentratsiooni vaheline suhe katsetingimustes, kui adsorptsiooni tasakaaluolek on püstitunud.

$$K_d = \frac{C_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (4)$$

kus:

$C_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = mullal adsorbeerunud aine sisaldus adsorptsiooni tasakaaluolekus (µg g⁻¹);

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = aine massikontsentratsioon vesifaasis adsorptsiooni tasakaaluolekus (µg cm⁻³). See kontsentratsioon määratakse analüütiliselt, võttes arvesse pimekatsetega saadud väärtusi;

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = mullal adsorbeerunud aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus (µg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus (µg);

m_{soil} = mullafaasi kogus, väljendatud mulla kuivmassina (g);

V_0 = mullaga kokku puutuva vesifaasi esialgne ruumala (cm³).

A_{eq} ja K_d vaheline suhe saadakse võrrandist:

$$K_d = \frac{A_{\text{eq}}}{100 - A_{\text{eq}}} \cdot \frac{V_0}{m_{\text{soil}}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (5)$$

▼B

kus:

A_{eq} = adsorptsiooniprotsent adsorptsiooni tasakaaluolekus, %

Orgaanilise süsiniku suhtes normaliseeritud adsorptsioonitegur K_{oc} seob jaotusteguri K_d mullaproovi orgaanilise süsiniku sisaldusega:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}\text{)} \quad (6)$$

kus:

$\%OC$ = orgaanilise süsiniku protsent mullaproovis (g^{-1}).

K_{oc} -tegur esindab ühtset väärtust, mis iseloomustab peamiselt mitte-polaarsete orgaaniliste kemikaalide jaotumist mullas või sademes oleva orgaanilise süsiniku ja vee vahel. Nende kemikaalide adsorptsioon viiakse korrelatsiooni tahke sorbeeriva orgaanilise aine sisaldusega (7); seega sõltuvad K_{oc} väärtused humiinosakeste eriomadustest, mille sorptsioonivõime on sõltuvalt päritolust, tekkest jne märkimisväärselt erinev.

2.1.1. Adsorptsiooniisotermid

Freundlichi adsorptsiooniisotermide võrrand seob adsorbeerunud uuritava aine koguse uuritava aine kogusega lahuses tasakaaluolekus (võrrand 8).

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} \quad (7)$$

Võrrand (8) on Freundlichi adsorptsioonivõrrand:

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{1/n} \text{ (}\mu\text{g g}^{-1}\text{)} \quad (8)$$

või lineaarsena:

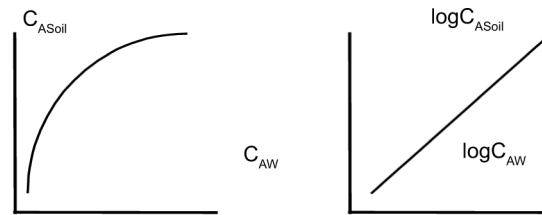
$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (9)$$

kus:

K_F^{ads} = dimensiooni $\text{cm}^3 \text{ l/m g}^{-1}$

n = regressioonikonstant; $1/n$ on tavaliselt vahemikus 0,7–1,0, mis näitab, et sorptsiooni puudutavad andmed on sageli natuke mittelineaarsed.

Joonistatakse võrrandid 8 ja 9 ning arvutatakse K_F^{ads} ja $1/n$ väärtused regressioonanalüüsi abil, kasutades võrrandit 9. Arvutatakse ka logaritmvõrrandi korrelatsioonikordaja r^2 . Selliste graafikute näited esitatakse joonisel 2.

▼ B

Joonis 2. Freundlichi adsorptsioonigraafik, normaalne ja lineaarne.

2.1.2. Massitasakaal

Massitasakaalu (MB) määratakse kui pärast adsorptsiooniuringut analüütiliselt regenereeritava aineprotsendi suhet aine nominaalsesse kogusesse uuringu alguses.

Andmete töötlemine erineb, kui lahusti lahustub vees täielikult. Veest lahustuva lahusti korral võib kohaldada punktis „Desorptsioon” kirjeldatud andmete töötlemist, et kindlaks määrata lahusti ekstraheerimise abil regenereeritud aine kogus. Kui lahusti veeslahustuvus on väiksem, tuleb regenereeritud kogus mõõta.

Massitasakaal MB adsorptsiooni jaoks arvutatakse järgmiselt: eeldatakse, et tegur (m_E) vastab mullast ja katseanuma seintelt orgaanilise lahusti abil ekstraheeritud uuritava kemikaalide masside summale:

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} (\%) \quad (10)$$

kus:

MB = massitasakaal (%)

m_E = mullast ja katseanuma seintelt kahes etapis väljutatud uuritava aine kogumass (μg)

C_0 = mullaga kokku puutuva katselahuse esialgne massikontsentratsioon ($\mu\text{g cm}^{-3}$)

V_{rec} = adsorptsiooni tasakaaluoleku järel regenereeritud supernatandi ruumala (cm^{-3}).

2.2. DESORPTSIOON

Desorptsiooni (D) määratakse desorbeerunud uuritava aine protsendina eelnevalt adsorbeerunud aine koguse suhtes katsetingimustes:

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100(\%) \quad (11)$$

kus:

D_{t_i} = desorptsiooniprotsent ajahetkel t_i (%);

▼ B

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = mullast desorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel t_i (μg);

$m_s^{ads}(eq)$ = mullal adsorbeerunud uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg).

Üksikasjalik teave, kuidas arvutada desorptsiooniprotsenti D_i paralleel- ja jadameetodite korral, on esitatud 5. liites.

Ilmne desorptsioonitegur (K_{des}) on katsetingimustes mullafaasi jäänud aine sisalduse ja vesilahuses desorbeerunud aine massikontsentratsiooni vaheline suhe, kui desorptsiooni tasakaaluolek on püstitunud:

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{V_T}{m_{soil}} (\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad (12)$$

kus:

K_{des} = desorptsioonitegur ($\text{cm}^3 \text{ g}^{-1}$);

$m_{aq}^{des}(eq)$ = desorbeerunud uuritava aine kogumass desorptsiooni tasakaaluolekus (μg);

V_T = desorptsioonikineetika uuringu jooksul mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguumala (cm^3).

Juhised $m_{aq}^{des}(eq)$ arvutamiseks esitatakse 5. liites pealkirja „Desorptsioon” all.

Märkus

Kui eelnev adsorptsiooniuring tehti paralleelmeetodiga, peetakse võrrandis (12) toodud ruumala V_T sama suureks kui V_0 .

2.2.1. Desorptsiooniisotermid

Freundlichi desorptsiooniisotermide võrrand seob mullale jääva adsorbeerunud uuritava aine sisalduse uuritava aine kontsentratsiooniga lahuses desorptsiooni tasakaaluolekus (võrrand 16).

Iga katseklasi kohta arvutatakse mullale jääv adsorbeerunud aine sisaldus desorptsiooni tasakaaluolekus järgmiselt:

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (13)$$

$m_{aq}^{des}(eq)$ määratletakse

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_T} - m_{aq}^A (\mu\text{g}) \quad (14)$$

kus:

$C_s^{des}(eq)$ = mulda jääv adsorbeerunud uuritava aine sisaldus desorptsiooni tasakaaluolekus ($\mu\text{g g}^{-1}$);

$m_m^{des}(eq)$ = aine analüütiliselt määratud mass vesifaasis desorptsiooni tasakaaluolekus (μg);

▼ B

m_{aq}^{A} = osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg)

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg):

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_{\text{R}}}{V_0} \right) \quad (15)$$

V_{r}^{F} = uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist võetud lahuse ruumala desorptsiooni tasakaaluolekus (cm^3);

V_{R} = adsorptsiooni tasakaaluoleku saavutamise järel katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala, mis asendatakse sama ruumala 0,01 M CaCl_2 lahusega (cm^3).

Võrrand (16) on Freundlichi desorptsioonivõrrand:

$$C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = K_{\text{F}}^{\text{des}} \cdot C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})^{1/n} (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

või lineaarsena:

$$\log C_{\text{s}}^{\text{des}}(\text{eq}) = \log K_{\text{F}}^{\text{des}} + 1/n \cdot \log C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq}) \quad (17)$$

Kus:

$K_{\text{F}}^{\text{des}}$ = Freundlichi desorptsioonitegur;

n = regressioonikonstant;

$C_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$ = aine massikontsentratsioon vesifaasis desorptsiooni tasakaaluolekus ($\mu\text{g cm}^{-3}$).

Võib joonestada võrrandid 16 ja 17 ning arvutada $K_{\text{F}}^{\text{des}}$ ja $1/n$ väärtused regressioonanalüüsi abil, kasutades võrrandit 17.

Märkus

Kui Freundlichi adsorptsiooni või desorptsiooni eksponent $1/n$ on võrdne ühega, võrduvad siduvad Freundlichi adsorptsiooni ja desorptsiooni konstandid ($K_{\text{F}}^{\text{ads}}$ ja $K_{\text{F}}^{\text{des}}$) adsorptsiooni või desorptsiooni tasakaalukonstantidega (vastavalt K_{d} ja K_{des}), ning C_{s} vs C_{aq} graafikud on lineaarsed. Kui eksponendid ei võrdu ühega, on graafikud teljestikus C_{s} vs C_{aq} mittelineaarsed ning adsorptsiooni ja desorptsioonikonstandid erinevad isothermide erinevates kohtades.

2.2.2. Katsearuanne

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet:

- kasutatud mullaproovide täielik identifitseerimine, sealhulgas:
- geograafiline viide asukohale (laiuskraad, pikkuskraad);
- proovivõtu kuupäev;

▼B

- kasutusviis (nt põllumajandusmaa, mets jne);
- proovivõtu sügavus;
- liiva/saviliiva/savi sisaldus;
- pH väärtused (0,01 M CaCl₂ lahuses);
- orgaanilise süsiniku sisaldus;
- orgaanilise ainese sisaldus;
- lämmastiku sisaldus;
- C/N suhe;
- katioonide neelamismahutavus (mmol/kg);
- kogu teave mullaproovide kogumise ja ladustamise kohta;
- vajaduse korral kogu oluline teave uuritava aine adsorptsiooni/-desorptsiooni tõlgendamiseks;
- viited iga parameetri määratlemisel kasutatud meetoditele;
- vajaduse korral teave uuritava aine kohta;
- katsete temperatuur;
- tsentrifuugimise tingimused;
- uuritava aine analüüsimisel kasutatud menetlus;
- uuritava aine põhilahuse ettevalmistamisel solubiliseeriva aine kasutamise põhjendus;
- vajaduse korral arvutustes tehtud paranduste selgitamine;
- andmed vastavalt tabeli vormile (6. liide) ja graafilisele esitlemisele;
- kogu teave ja vaatlused, mis aitavad uuringu tulemusi tõlgendada.

3. **VIITED**

- 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) Fränzele 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)-1,3,5-triazine herbicides and their breakdown in soil under the influence of adsorption”. Pestic. Sci. 12, pp. 45–52.
- 24) Guth J. A., Gerber H. R., and Schlaepfer T., (1977), „Effect of adsorption, movement and persistence on the biological availability of soil-applied pesticides”. Proc. Br. Crop Prot. Conf., 3, pp. 961–971.
- 25) Osgerby J. M., (1973), „Process affecting herbicide action in soil”. Pestic. Sci., 4, pp. 247–258.
- 26) Guth J. A., (1972), „Adsorptions- und Einwascheverhalten von Pflanzenschutzmitteln in Böden”. Schr. Reihe Ver. Wass.-Boden-Lufthyg. Berlin-Dahlem, Heft 37, pp. 143–154.
- 27) Hamaker J. W., (1975), „The interpretation of soil leaching experiments”, in Environmental Dynamics of Pesticides (eds R. Haque and V.H. freed), pp. 135-172, Plenum Press, NY.
- 28) Helling C. S., (1971), „Pesticide mobility in soils”. Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 35, pp. 732–210.
- 29) Hamaker J. W., (1972), „Diffusion and volatilization” in Organic chemicals in the soil environment (C.A.I. Goring and J. W. Hamaker eds), Vol. I, pp. 49–143.
- 30) Burkhard N. and Guth J. A., (1981), „Rate of volatilisation of pesticides from soil surfaces; Comparison of calculated results with those determined in a laboratory model system”. Pestic. Sci. 12, pp. 37–44.
- 31) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R.F., and Enfield C.G., (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in Treatment and Disposal of Pesticide Wastes, pp. 297-325, Acs Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
- 32) Gustafson D. I., (1989), „Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability”. 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 Karickhoff 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. Romberg., (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 runoff between the solution and adsorbed phase”, CREAMS, in *A Field Scale Model for Chemicals, Run-off and Erosion from Agricultural Management Systems*, Chapter 19, Vol. III: Supporting Documentation, USDA Conservation Research report.
- 50) ISO Standard Compendium Environment: Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis. First Edition (1994).
- 51) Scheffer F., and Schachtschabel, *Lehrbuch der Bodenkunde*, F. Enke Verlag, Stuttgart (1982), 11th edition.
- 52) Black, Evans D. D., White J. L., Ensminger L. E., and Clark F. E., eds. „Methods of Soil Analysis”, Vol 1 and 2, American Society of Agronomy, Madison, WI, 1982.

▼B

- 53) ISO/DIS 10381-1 Soil Quality – Sampling – Part 1: Guidance on the design of sampling programmes.
- 54) ISO/DIS 10381-2 Soil Quality – Sampling – Part 2: Guidance on sampling techniques.
- 55) ISO/DIS 10381-3 Soil Quality – Sampling – Part 3: Guidance on safety of sampling.
- 56) ISO/DIS 10381-4 Soil Quality – Sampling – Part 4: Guidance on the investigation of natural and cultivated soils.
- 57) ISO/DIS 10381-5 Soil Quality – Sampling – Part 5: Guidance on the investigation of soil contamination of urban and industrial sites.
- 58) ISO 10381-6, 1993: Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory.
- 59) Green R. E., and Yamane V. K., (1970), „Precision in pesticide adsorption measurements”. *Soil Sci. Am. Proc*, 34, pp. 353–354.
- 60) Grover R., and Hance R. J. (1970), „Effect of ratio of soil to water on adsorption of linuron and atrazine”. *Soil Sci.*, pp. 109–138.
- 61) Boesten, J. J. T. I., „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in pesticide/soil system”. *Pest. Sci.* 1990, 30, pp. 31–41.
- 62) Boesten, J. J. T. I. „Influence of soil/liquid ratio on the experimental error of sorption coefficients in relation to OECD guideline 106”. *Proceedings of 5th international workshop on environmental behaviour of pesticides and regulatory aspects, Brussels, 26-29 April 1994.*
- 63) Bastide J., Cantier J. M., et Coste C., (1980), „Comportement de substances herbicides dans le sol en fonction de leur structure chimique”. *Weed Res.* 21, pp. 227–231.
- 64) Brown D. S., and Flagg E. W., (1981), „Empirical prediction of organic pollutants sorption in natural sediments”. *J. Environ.-Qual.*, 10(3), pp. 382–386.
- 65) Chiou C. T., Porter P. E., and Schmedding D. W., (1983), „Partition equilibria of non-ionic organic compounds between soil organic matter and water”. *Environ. Sci. Technol.*, 17(4), pp. 227–231.
- 66) Gerstl Z., and Mingelgrin U., (1984), „Sorption of organic substances by soils and sediments”. *J. Environm. Sci. Health*, B19 (3), pp. 297–312.
- 67) Vowles P. D., and Mantoura R. F. C., (1987), „Sediment-water partition coefficient and HPLC retention factors of aromatic hydrocarbons”. *Chemosphere*, 16(1), pp. 109–116.
- 68) Lyman W. J., Reehl W. F. and Rosenblatt D. H. (1990). *Handbook of Chemical Property Estimation Methods. Environmental Behaviour of Organic Compounds.* American Chemical Society, Washington DC.
- 69) Keniga E. E., and Goring, C. A. I. (1980). „Relationship between water solubility, soil sorption, octanol-water partitioning and concentration of chemicals in the biota” in *Aquatic Toxicology* (eds J.G. Eaton, et al), pp.78-115, ASTM STP 707, Philadelphia.

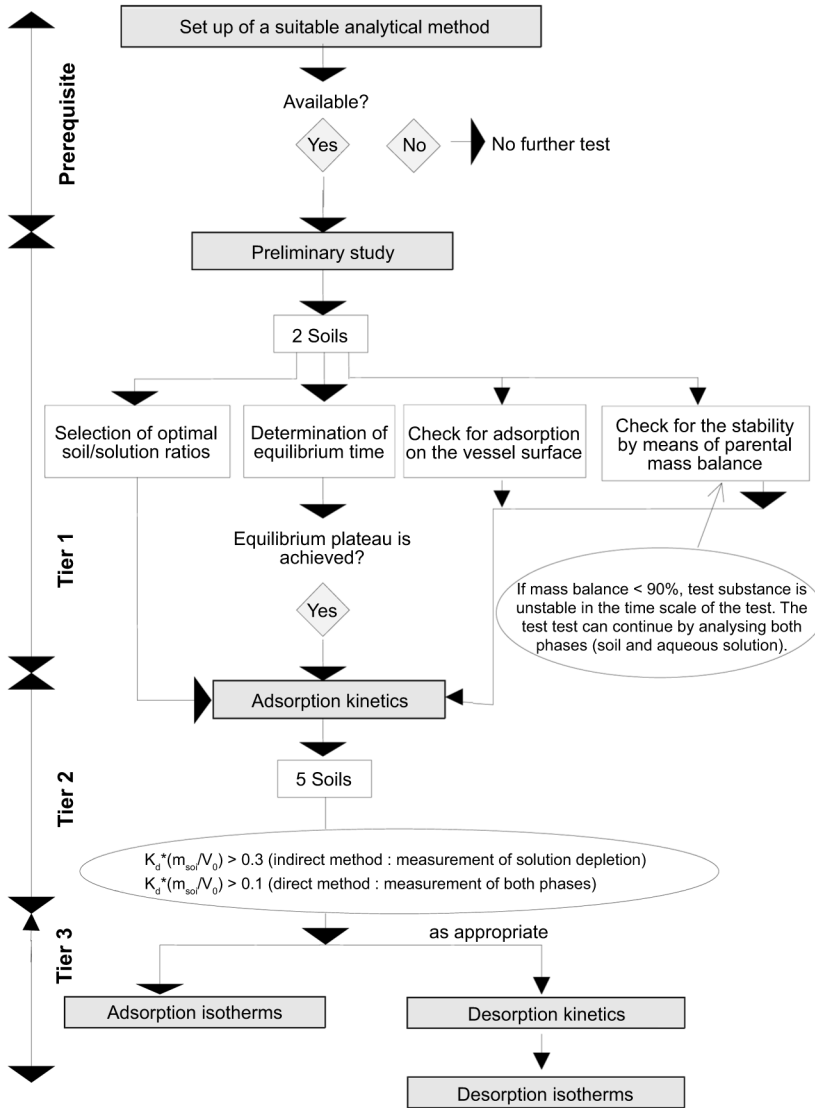
▼B

- 70) Chiou C. T., Peters L. J., and Freed V. H., (1979), „A physical concept of soil-water equilibria for non-ionic organic compounds”. *Science*, Vol. 206, pp. 831–832.
- 71) Hassett J. J., Banwart W. I., Wood S. G., and Means J. C., (1981), „Sorption of/-Naphtol: implications concerning the limits of hydrophobic sorption”. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 45, pp. 38–42.
- 72) Karickhoff S. W., (1981), „Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils”. *Chemosphere*, Vol. 10(8), pp. 833–846.
- 73) Moreale A., van Bladel R., (1981), „Adsorption de 13 herbicides et insecticides par le sol. Relation solubilité-reactivité”. *Revue de l'Agric.*, 34 (4), pp. 319–322.
- 74) Müller M., Kördel W. (1996), „Comparison of screening methods for the determination/estimation of adsorption coefficients on soil”. *Chemosphere*, 32(12), pp. 2493–2504.
- 75) Kördel W., Kotthoff G., Müller M. (1995), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – results of a ring test”. *Chemosphere* 30 (7), pp. 1373–1384.
- 76) Kördel W., Stutte J., Kotthoff G. (1993), „HPLC – screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil – comparison of different stationary phases”. *Chemosphere* 27 (12), pp. 2341–2352.
- 77) Hance, R. J., (1967), „The Speed of Attainment of Sorption Equilibria in Some Systems Involving Herbicides”. *Weed Research*, Vol. 7, pp. 29–36.
- 78) Koskinen W. C, and Harper S. S., (1990), „The retention processes: mechanisms” in *Pesticides in the Soil Environment: Processes, Impacts and Modelling* (ed. H.H. Cheng). *Soil Sci. Soc. Am. Book Series*, No. 2, Madison, Wisconsin.
- 79) Cohen S. Z., Creeger S. M., Carsel R. F., and Enfield C. G. (1984), „Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses”, in *Treatment and Disposal of Pesticide Wastes*, pp.297-325, ACS Symp. Ser. 259, American Chemical Society, Washington, DC.
- 80) Giles C. H., (1970), „Interpretation and use of sorption isotherms” in *Sorption and Transport Processes in Soils*. S.C.I. Monograph No. 37, pp. 14–32.
- 81) Giles, C. H.; McEwan J. H.; Nakhwa, S.N. and Smith, D., (1960), „Studies in adsorption: XL A system of classification of solution adsorption isotherms and its use in the diagnosis of adsorption mechanisms and in measurements of pesticides surface areas of soils”. *J. Chem. Soc.*, pp. 3973–93.
- 82) Calvet R., Terce M., and Arvien J. C, (1980), „Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants: 3. Caractéristiques générées de l'adsorption”. *Ann. Agron.* 31: pp. 239–251.
- 83) Bedbur E., (1996), „Anomalies in the Freundlich equation”, *Proc. COST 66 Workshop, Pesticides in soil and the environment*, 13-15 May 1996, Stratford-upon-Avon, UK.
- 84) Guth, J. A., (1985), „Adsorption/desorption”, in *Joint International Symposium, Physicochemical Properties and their Role in Environmental Hazard Assessment*, July 1-3, Canterbury, UK.
- 85) *Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).

▼ B

1. liide

Katse skeem



▼ B

2. liide

ANALÜÜSIMETODI TÄPSUSE JA KONTSENTRATSIOONIMUUTUSE
MÕJU ADSORPTSIOONITULEMUSTE TÄPSUSELE

Amount of soil $m_{\text{soil}} = 10 \text{ g}$
Volume of solution $V_0 = 100 \text{ cm}^3$

	$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ (μg)	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ ($\mu\text{g cm}^{-3}$)	R	$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ (μg)	$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})^*$ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	R_{\ddagger}	K_{d}^*	R_{\ddagger}
FOR A = 9 %								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ or $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	100	1,000	true value	10	1,00	true value	1	
	101	1,010	1 %	9	0,90	10 %	0,891	10,9 %
	105	1,050	5 %	5	0,50	50 %	0,476	52,4 %
	109	1,090	9 %	1	0,10	90 %	0,092	90,8 %
FOR A = 55 %								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ or $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	50,0	0,500	true value	60,0	6,00	true value	12,00	
	50,5	0,505	1 %	59,5	5,95	0,8 %	11,78	1,8 %
	52,5	0,525	5 %	57,5	5,75	4,0 %	10,95	8,8 %
	55,0	0,550	10 %	55,0	5,50	8,3 %	10,00	16,7 %
FOR A = 99 %								
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ or $C_0 = 1,100 \mu\text{g/cm}^3$	1,100	0,011	true value	108,9	10,89	true value	990	
	1,111	0,01111	1 %	108,889	10,8889	0,01 %	980	1,0 %
	1,155	0,01155	5 %	108,845	10,8845	0,05 %	942	4,8 %
	1,21	0,0121	10 %	108,790	10,8790	0,10 %	899	9,2 %

$$*m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}), C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = \frac{[C_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})] V_0}{m_{\text{soil}}}. K_{\text{d}} = \frac{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \frac{V_0}{m_{\text{soil}}}$$

$m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = mass of the test substance in the soil phase at equilibrium, μg ;

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = mass of the test substance in the aqueous phase at equilibrium, μg ;

$C_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = content of the test substance in the soil phase at equilibrium, $\mu\text{g g}^{-1}$;

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = mass concentration of the test substance in the aqueous phase at equilibrium, $\mu\text{g cm}^{-3}$;

R = analytical error in the determination of the $m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$;

R_{\ddagger} = calculated error due to the analytical error R.

▼B

3. Liide

K_d HINDAMISE TEHNİKAD

1. Hindamistehnikad võimaldavad ennustada K_d väärtusi, mis põhinevad korrelatsioonil, näiteks P_{ow} väärtustega (12, 39, 63–68), veelahustuvust puudutavate andmetega (12, 19, 21, 39, 68–73) või polaarsust puudutavate andmetega, mis on saadud pöördfaasilise HPLC kasutamisel (74–76). Tabelites 1 ja 2 esitatud K_{oc} ja K_{om} väärtused on arvatud nendest võrranditest ja seega K_d kaudselt võrranditest:

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%oc} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1}) \quad K_{om} = \frac{K_d}{1,724} \cdot \frac{100}{\%oc} \text{ (cm}^3 \text{ g}^{-1})$$

2. Nende korrelatsioonide kontseptsioon põhineb kahel eeldusel: 1) aine adsorptsiooni mõjutab peamiselt just mullas olev orgaaniline aines; ja 2) kaasatud interaktsioonid on peamiselt mittepolaarsed. Seetõttu 1) ei saa neid korrelatsioone kasutada täielikult või teatud ulatuses polaarse ainet puhul ja 2) juhtudel, kui mullas esineva orgaanilise ainese sisaldus on väga väike (12). Lisaks, kuigi on avastatud rahuldavad korrelatsioonid P_{ow} ja adsorptsiooni vahel (19), ei saa sama öelda veelahustuvuse ja adsorptsiooni vahelise suhte kohta (19, 21); siiani on sellealased uuringud väga vasturääkivad.
3. Mõned näited adsorptsiooniteguri ja oktanooli-vee jaotusteguri vahelisest korrelatsioonist ja suhtest vees lahustuvusse on esitatud vastavalt tabelites 1 ja 2.

Tabel 1

Näited adsorptsiooni jaotusteguri ja oktanooli-vee jaotusteguri vahelisest korrelatsioonist; rohkem näiteid viidetes 12, 68.

Ained	Korrelatsioonid	Autorid
Asendatud karbamiidid	$\log K_{om} = 0,69 + 0,52 \log P_{ow}$	Briggs (1981) (39)
Aromaatsed klooritud ained	$\log K_{oc} = - 0,779 + 0,904 \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (65)
Erinevad pestitsiidid	$\log K_{om} = 4,4 + 0,72 \log P_{ow}$	Gerstl ja Mingelgrin (1984) (66)
Aromaatsed süsivesinikud	$\log K_{oc} = - 2,53 + 1,15 \log P_{ow}$	Vowles ja Mantoura (1987) (67)

Tabel 2

Näited adsorptsiooni jaotusteguri ja vees lahustuvuse vahelisest korrelatsioonist; rohkem näiteid viidetes 68, 69.

Ühendid	Korrelatsioonid	Autorid
Erinevad pestitsiidid	$\log K_{om} = 3,8 - 0,561 \log S_w$	Gerstl ja Mingelgrin (1984) (66)
Alifaatsed, aromaatsed klooritud ained	$\log K_{om} = (4,040 \pm 0,038) - (0,557 \pm 0,012) \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (70)
α-naftool	$\log K_{oc} = 4,273 - 0,686 \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (71)
Tsüklilised, alifaatsed aromaatsed ained	$\log K_{oc} = - 1,405 - 0,921 \log S_w - 0,00953 \text{ (mp-25)}$	Karickhoff (1981) (72)
Erinevad ühendid	$\log K_{om} = 2,75 - 0,45 \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (73)

▼ B

4. liide

ARVUTUSED TSENTRIFUUGIMISTINGIMUSTE MÄÄRAMISEKS

1. Tsentrifuugimisaeg saadakse vastavalt järgmisele valemile, eeldades et osakesed on kerakujulised:

$$t = \frac{9}{2} \left[\frac{\eta}{\omega^2 r_p^2 (\rho_s - \rho_{aq})} \right] \ln (R_b/R_t) \quad (1)$$

Lihtsustamise eesmärgil kirjeldatakse kõiki parameetreid SI-välistes ühikutes (g, cm).

kus:

ω = pöörlemissagedus (= $2 \pi \text{ rpm}/60$), rad s^{-1} ;

rpm = pööret minutis;

η = lahuse viskoossus, $\text{g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$;

r_p = osakese raadius, cm;

ρ_s = mulla tihedus, g cm^{-3} ;

ρ_{aq} = lahuse tihedus, g cm^{-3} ;

R_t = vahemaa tsentrifuugi rootori keskkohast tsentrifuugitorus oleva lahuse pinnani, cm;

R_b = vahemaa tsentrifuugi rootori keskkohast tsentrifuugitoru põhjani, cm;

$R_b - R_t$ = mulla/lahuse segu pikkus tsentrifuugitorus, cm.

Üldiselt kasutatakse täieliku eraldumise tagamiseks arvutatud aegade kahekordistamist.

2. Võrrandit 1 on võimalik veel lihtsustada, kui oletada, et lahuse viskoossus (η) ja tihedus (ρ_{aq}) on võrdsed vee viskoossuse ja tihedusega temperatuuril $25 \text{ }^\circ\text{C}$; seega, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ja $\rho_{aq} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$.

Seega saadakse tsentrifuugimisaeg võrrandiga 2:

$$t = \frac{3.7}{(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2 (\rho_s - 1)} \ln \frac{R_b}{R_t} \quad (2)$$

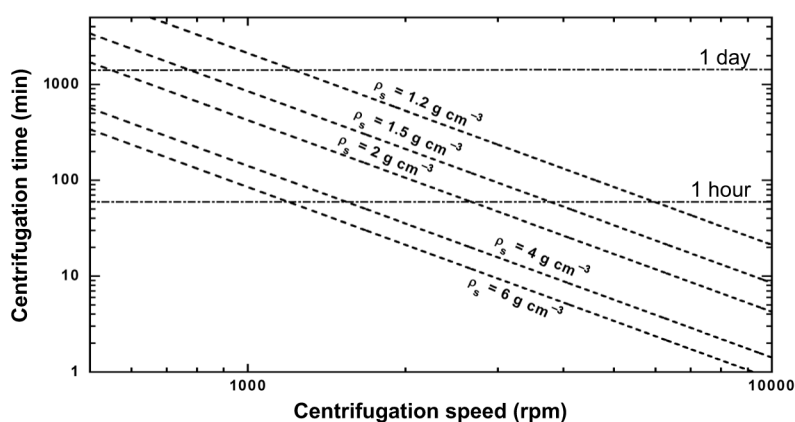
3. Võrrandist 2 ilmneb, et tsentrifuugimistingimuste, st aja (t) ja kiiruse (rpm) määratlemisel on tähtsad kaks parameetrit, et saavutada konkreetse suurusega osakeste jagunemine (meie puhul $0,1 \text{ } \mu\text{m}$ raadiusega): 1) mulla tihedus ja 2) segu pikkus tsentrifuugitorus ($R_b - R_t$), st vahemaa, mille mullaosake läbib lahuse pinnalt toru põhjani; on selge, et fikseeritud ruumala korral sõltub segu pikkus torus toru raadiuse ruudust.
4. Joonisel 1 on näidatud, kuidas tsentrifuugimise kiiruse (rpm) funktsioonina esitatud tsentrifuugimise aeg (t) varieerub erinevate mulla tiheduste (ρ_s) (joonis 1a) ja tsentrifuugitorus oleva segu erinevate pikkuste vahel (joonis 1b). Joonisel 1a on selgesti näha mulla tiheduse mõju; näiteks klassikalise 3000 rpm tsentrifuugimisel on tsentrifuugimise aeg ligikaudu 240 minutit, kui mulla tihedus on $1,2 \text{ g/cm}^3$, ja vaid 50 minutit, kui tihedus on $2,0 \text{ g/cm}^3$. Samamoodi näitab joonis 1b, et klassikalise 3000 rpm tsentrifuugimisel on tsentrifuugimise aeg ligikaudu 50 minutit, kui segu pikkus on 10 cm, ja vaid 7 minutit, kui pikkus on 1 cm. Siiski on tähtis leida optimaalne suhe võimalikult väikest pikkust nõudva tsentrifuugimise ja pärast tsentrifuugimist katse tegija poolt võimalikult lihtsalt faaside eraldamise vahel.

▼ B

5. Lisaks, kui määratakse katsetingimused mulla/lahuse faaside eraldamiseks, on tähtis arvestada võimaliku kolmanda „pseudofaasi”, kolloidide olemasolu. Nendel osakestel, mille suurus on alla $0,2 \mu\text{m}$, võib olla tähtis mõju kogu aine adsorptsioonimehhanismile mulla suspensioonis. Kui tsentrifuugitakse eespool kirjeldatud viisil, jäävad kolloidid vesifaasi ja neid analüüsitakse koos vesifaasiga. Seega jääb teave nende mõju kohta saamata.

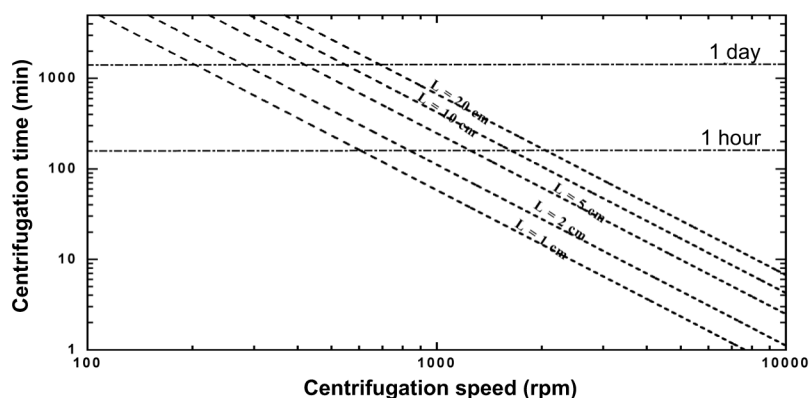
Kui uuringut tegeval laboratooriumil on ultratsentrifuugimise või ultrafiltrereerimise võimalused, võib aine adsorptsiooni/desorptsiooni mullas uurida põhjalikumalt, kaasa arvatud teave aine adsorptsiooni kohta kolloididele. Sellisel juhul tuleks kasutada ultratsentrifuugimist $60\,000 \text{ rpm/min}$ või ultrafiltrereerimist, kui filtri poorsus on $100\,000$ daltonit, et eraldada järgmised kolm faasi: muld, kolloidid ja lahus. Katsearuannet tuleks samuti vastavalt muuta, et kõigis kolmes faasis ainet analüüsida.

Joonis 1a.



Tsentrifuugimise kiiruse (rpm) funktsioonina esitatud tsentrifuugimise aja (t) varieerumine erinevate mullatiheduste puhul (ρ_s). $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ja $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ temperatuuril $25 \text{ }^\circ\text{C}$.

Joonis 1b.



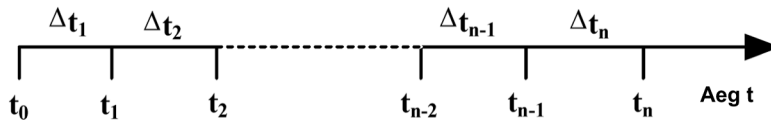
Tsentrifuugimise kiiruse (rpm) funktsioonina esitatud tsentrifuugimise aja (t) varieerumine erinevate pikkuste puhul tsentrifuugimistorus ($R_b - R_t$) = L; $R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8,95 \times 10^{-3} \text{ g s}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $\rho_{\text{aq}} = 1,0 \text{ g cm}^{-3}$ temperatuuril $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ja kui $\rho_s = 2,0 \text{ g cm}^{-3}$.

▼ B

5. liide

ADSORPTSIOONI A (%) JA DESORPTSIOONI D (%) ARVUTAMINE

Menetluse ajagraafik on järgmine:



Kõikide arvutuste puhul eeldatakse, et uuritav aine on püsiv ega adsorbeeru märkimisväärselt konteineri seintele.

ADSORPTSIOON A (A %)a) *Paralleelmeetod*

Adsorptsiooniprotsent arvutatakse iga katseklaasi (i) kohta igal ajahetkel (t_i) vastavalt võrrandile:

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(t_i) \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (1)$$

Selle võrrandi tegurid võib arvutada järgmiselt:

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m_s^{\text{ads}}(t_i) = m_0 - C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(t_i) \cdot V_0 (\mu\text{g}) \quad (3)$$

kus:

$$A_{t_i} = A_{t_i}$$

$m_s^{\text{ads}}(t_i)$ = uuritava aine mass mullas ajahetkel t_i , kui analüüs tehakse (μg);

m_0 = uuritava aine mass katseklaasis uuringu alguses (μg);

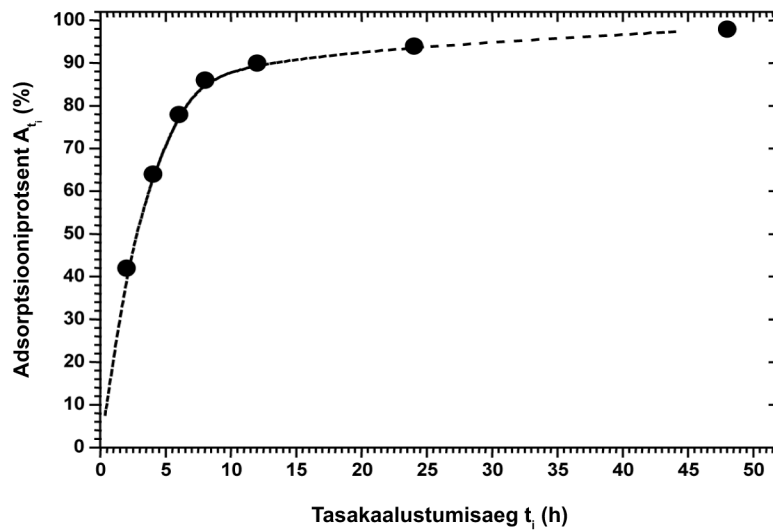
C_0 = mullaga kokkupuutuva katselahuse esialgne massikontsentratsioon ($\mu\text{g cm}^{-3}$);

▼ B

$C_{aq}^{ads}(t_i)$ = aine massikontsentratsioon vesifaasis analüüsi tegemise ajahetkel t_i ($\mu\text{g cm}^{-3}$); see kontsentratsioon määratakse analüütiliselt, võttes arvesse pimekatsetega saadud väärtused;

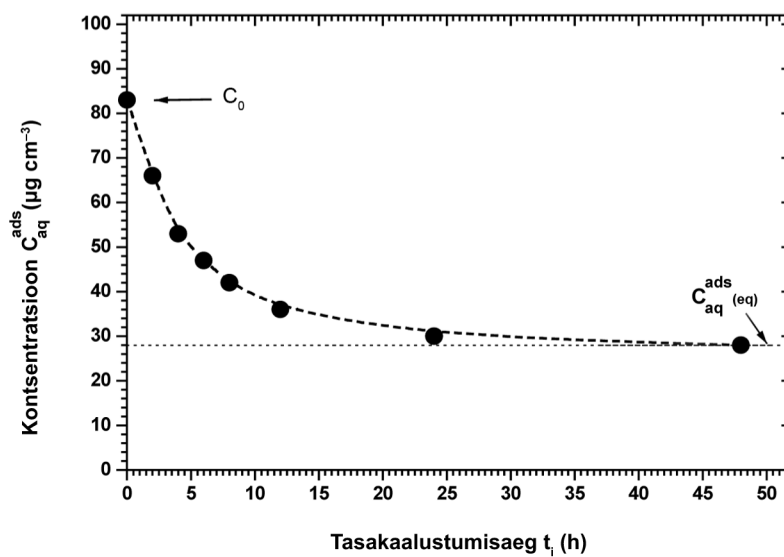
V_0 = mullaga kokkupuutuva uuritava lahuse esialgne ruumala (cm^3).

Adsorptsiooniprotsendi väärtused A_i või $C_{aq}^{ads}(t_i)$ esitatakse aja funktsioonina ja määratakse aeg, mis kulus sorptsioonitasakaaluoleku püstitumiseks. Näited sellistest graafikutest esitatakse vastavalt joonisel 1 ja 2.



Joonis 1

Adsorptsiooni tasakaaluoleku graafik



Joonis 2

Uuritava aine massikontsentratsioon vesifaasis (C_{aq}) aja funktsioonina

▼B

b) *Jadameetod*

Järgmistes võrrandites võetakse arvesse, et adsorptsioonimenetluseks mõõdetakse uuritavat ainet väikestes vesifaasi alikvootides määratletud ajavahemikel.

— Iga ajavahemiku jooksul arvutatakse mullal adsorbeerunud aine kogus järgmiselt:

— esimese ajavahemiku puhul $\Delta t_1 = t_1 - t_0$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1) = m_0 - m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) \quad (4)$$

— teise ajavahemiku puhul $\Delta t_2 = t_2 - t_1$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2) = m_m^{\text{ads}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_0}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (5)$$

— kolmanda ajavahemiku puhul $\Delta t_3 = t_3 - t_2$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_3) = m_m^{\text{ads}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_0 - v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_3) \cdot \left(\frac{V_0 - 2 \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (6)$$

— n-nda ajavahemiku puhul $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n) = m_m^{\text{ads}}(t_{n-1}) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-2) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) - m_m^{\text{ads}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_0 - (n-1) \cdot v_a^A}{v_a^A} \right) \quad (7)$$

— Adsorptsiooniprotsent igas ajavahemikus, $A_{\Delta t_i}$, arvutatakse järgmise võrrandi abil:

$$A_{\Delta t_i} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (8)$$

samal ajal kui desorptsiooniprotsent A_{t_i} ajahetkel t_i saadakse võrrandist:

$$A_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_s^{\text{ads}}(j)}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (9)$$

Adsorptsiooni väärtused A_{t_i} või $A_{\Delta t_i}$ (vastavalt uuringu vajadustele) esitatakse aja funktsioonina ja määratakse sorptsiooni tasakaaluoleku püstitumiseks kuluv aeg.

— Tasakaaluoleku püstitumise hetkel t_{eq}

— mullal adsorbeerunud uuritava aine mass on:

$$m_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (10)$$

▼ B

— uuritava aine mass lahuses on:

$$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) = m_0 - \sum_{\Delta t_i=1}^n m_s^{\text{ads}}(\Delta t_i) \quad (11)$$

— ja adsorptsiooniprotsent tasakaaluolekus on:

$$A_{\text{eq}} = \frac{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})}{m_0} \cdot 100(\%) \quad (12)$$

Eespool kasutatud parameetrid määratletakse järgmiselt:

$m_s^{\text{ads}}(\Delta t_1), m_s^{\text{ads}}(\Delta t_2), \dots, m_s^{\text{ads}}(\Delta t_n)$ = mullal adsorbeerunud aine mass vastavalt ajavahemike $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ jooksul (μg);

$m_m^{\text{ads}}(t_1), m_m^{\text{ads}}(t_2), \dots, m_m^{\text{ads}}(t_n)$ = vastavalt ajahetkedel $v_a^A t_1, t_2, \dots, t_n$ (μg)

$m_s^{\text{ads}}(\text{eq})$ = mullal adsorbeerunud aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg);

v_a^A = alikvoodi ruumala, milles uuritavat ainet mõõdetakse (cm^3);

$A_{\Delta t_i}$ = adsorptsiooniprotsent, mis vastab ajavahemikule Δt_i (%);

A_{eq} = adsorptsiooniprotsent adsorptsiooni tasakaaluolekus (%).

DESORPTSIOON D (%)

Ajahetke t_0 , kui desorptsioonikineetika katse algab, peetakse selleks hetkeks, kui uuritava aine maksimaalne eemaldatud ruumala (pärast adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitumist) asendatakse sama ruumala 0,01 M CaCl_2 lahusega.

a) Paralleelmeetod

Ajahetkel t_i mõõdetakse uuritava aine mass katseklaasist i (V_r^i) võetud vesifaasis ja desorbeerunud uuritava aine mass arvutatakse vastavalt võrrandile:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_m^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_0}{V_r^i} \right) - m_{\text{aq}}^A \quad (13)$$

Desorptsiooni tasakaaluolekus $t_i = t_{\text{eq}}$ ja seega $m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$

Ajavahemiku (Δt_i) jooksul desorbeerunud uuritava aine mass saadakse võrrandist:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-1} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j) \quad (14)$$

Desorptsiooniprotsent arvutatakse:

ajahetkel t_i võrrandist:

▼ B

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 (\%) \quad (15)$$

ja ajavahemikul (Δt_i) võrrandist:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 (\%) \quad (16)$$

kus:

D_{t_i} = desorptsiooniprotsent ajahetkel t_i (%);

$D_{\Delta t_i}$ = desorptsiooniprotsent, mis vastab ajavahemikule Δt_i (%);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)$ = desorbeerunud uuritava aine mass ajahetkel t_i (μg);

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i)$ = ajavahemikul Δt_i desorbeerunud uuritava aine mass (μg);

$m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i)$ = ajahetkel t_i analüütiliselt määratud uuritava aine mass lahuse ruumalas V_r^i , mis võetakse analüüsi jaoks (μg);

m_{aq}^{A} = osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg);

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \cdot \left(\frac{V_0 - V_R}{V_0} \right) \quad (17)$$

$m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$ = uuritava aine mass lahuses adsorptsiooni tasakaaluolekus (μg);

V_R = adsorptsiooni tasakaaluoleku püstitamise järel katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala, mis asendatakse sama ruumala 0,01 M CaCl_2 lahusega (cm^3);

V_r^i = uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist (i) võetud lahuse ruumala desorptsioonikineetika katses (cm^3).

Desorptsiooni väärtused D_i või D_i (vastavalt uuringu vajadustele) esitatakse aja funktsioonina ja määratakse desorptsiooni tasakaaluoleku püstitamiseks kuluv aeg.

b) *Jadameetod*

Järgmistes võrrandites võetakse arvesse, et eelnevals adsorptsioonimenetlus viidi läbi, määrates uuritava aine väikestes vesifaasi alikvootides (v_a^{A}) (jadameetod punktis 1.9 „Katse käik”). Eeldatakse, et a) pärast adsorptsioonikineetika katses katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala asendati sama ruumala 0,01 M CaCl_2 lahusega (v_R) ja b) desorptsioonikineetika katse jooksul mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguruumala (v_T) püsib konstantsena ja esitatakse võrrandiga:

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^{\text{A}}(i) \quad (18)$$

▼ B

Ajahetkel t_i :

— määratakse uuritava aine mass väikeses alikvoodis (v_a^D) ja arvutatakse desorbeerunud mass vastavalt võrandile:

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_i) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_a^D} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - (i-1) \cdot v_a^D)}{V_{\text{T}}} \right) \quad (19)$$

— desorptsiooni tasakaaluolekus, $t_i = t_{\text{eq}}$, seegam $_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i) = m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\text{eq})$

— desorptsiooniprotsent D_{t_i} arvutatakse järgmisest võrandist:

$$D_{t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (20)$$

Ajavahemikus (Δt_i)

Iga ajavahemiku jooksul arvutatakse desorbeerunud aine kogus järgmiselt:

— esimese ajavahemiku puhul $\Delta t_1 = t_1 - t_0$ ja

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_1) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_a^D} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \quad \text{ja} \quad m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_1) = m_{\text{s}}^{\text{aq}}(\text{eq}) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \quad (21)$$

— ajavahemiku n puhul $\Delta t_n = t_n - t_{n-1}$

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2) = m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_2) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_a^D} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_a^D)}{V_{\text{T}}} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - v_a^D)}{V_{\text{T}}} \right)$$

ja

$$m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_2) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - [m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1) + m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2)] \quad (22)$$

— teise ajavahemiku puhul $\Delta t_2 = t_2 - t_1$ ja

$$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n) = \left[m_{\text{m}}^{\text{des}}(t_n) \cdot \left(\frac{V_{\text{T}}}{v_a^D} \right) - m_{\text{aq}}^{\text{A}} \cdot \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-1) \cdot v_a^D)}{V_{\text{T}}} \right) - \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \left(\frac{(V_{\text{T}} - (n-i) \cdot v_a^D)}{V_{\text{T}}} \cdot m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \right) \right]$$

ja

$$m_{\text{s}}^{\text{des}}(t_n) = m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq}) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i) \quad (23)$$

Lõpuks arvutatakse desorptsiooniprotsent igas ajavahemikus, $D_{\Delta t_i}$, kasutades järgmist võrandit:

$$D_{\Delta t_i} = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (24)$$

samal ajal kui desorptsiooniprotsent D_{t_i} ajahetkel t_i saadakse võrandist:

$$D_{t_i} = \frac{\sum_{j=\Delta t_1}^{\Delta t_i} m_{\text{aq}}^{\text{des}}(j)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 = \frac{m_{\text{aq}}^{\text{des}}(t_i)}{m_{\text{s}}^{\text{ads}}(\text{eq})} \cdot 100 \text{ (\%)} \quad (25)$$

▼ B

milles eespool kasutatud parameetrid määratletakse järgmiselt:

$m_s^{\text{des}}(\Delta t_1), m_s^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_s^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = aine mass, mis jääb mullale adsorbeerununa vastavalt pärast ajavahemike $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ möödumist (μg);

$m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_1), m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_2), \dots, m_{\text{aq}}^{\text{des}}(\Delta t_n)$ = uuritava aine mass, mis on desorbeerunud vastavalt ajavahemike $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ jooksul (μg);

$m_m^{\text{des}}(t_1), m_m^{\text{des}}(t_2), \dots, m_m^{\text{des}}(t_n)$ = vastavalt ajahetkedel (v_a^{D}) t_1, t_2, \dots, t_n (μg)

V_T = desorptsioonikineetika määramisel jadameetodiga mullaga Kokku puutuva vesifaasi koguruumala (cm^3);

m_{aq}^{A} = osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaalulekus (μg)

$$m_{\text{aq}}^{\text{A}} = \left(\frac{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^{\text{A}}(i) \right) - V_R}{\left(V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^{\text{A}}(i) \right)} \right) \cdot m_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (26)$$

V_R = adsorptsiooni tasakaaluleku püstitamise järel katseklaasist eemaldatud supernatandi ruumala, mis asendatakse sama ruumala 0,01 M CaCl_2 lahusega (cm^3);

v_a^{D} = desorptsioonikineetika määramisel jadameetodiga analüütilisel eesmärgil katseklaasist (i) võetud alikvoodi ruumala (cm^3);

$$v_a^{\text{D}} \leq 0,02 \cdot V_T \quad (27)$$

▼B

	Tähis	Ühikud	Tasakaaluoleku saabumise aeg	Tasakaaluoleku saabumise aeg	Tasakaaluoleku saabumise aeg	Tasakaaluoleku saabumise aeg
--	-------	--------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------

Pärast loksutamist ja tsentrifuugimist

KAUDNE MEETOD

Paralleelmeetod

Uuritava aine kontsentratsioon vesifaasis, sisaldab pimekatsest tulenevat parandust	$C_{aq}^{ads}(t_i)$	$\mu\text{g cm}^{-3}$							
---	---------------------	-----------------------	--	--	--	--	--	--	--

Jadameetod

Uuritava aine mõõdetud mass alikvoodis _a ^A	$m_m^{ads}(t_i)$	μg							
--	------------------	---------------	--	--	--	--	--	--	--

OTSENE MEETOD

Mullal adsorbeerunud uuritava aine mass	$m_s^{ads}(t_i)$	μg							
---	------------------	---------------	--	--	--	--	--	--	--

Adsorptsiooni arvutamine

Adsorptsioon	A_{t_i}	%							
	$A_{\Delta t_i}$	%							
Keskmsed									
Adsorptsioonitegur	K_d	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$							
Keskmsed									
Adsorptsioonitegur	K_{oc}	$\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$							
Keskmsed									

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): %

Temperatuur: °C

Adsorptsiooni uuring: pimekatsed ja kontroll

	Tähis	Ühikud	Pimekatse		Pimekatse		Kontroll	
Katseklaas nr								
Kaalutud mullad		g					0	0
Vee kogus kaalutud mullas (arvutatud)		cm^3					—	—
Lisatud 0,01 M CaCl_2 lahuse ruumala		cm^3						
Lisatud uuritava aine põhilahuse ruumala		cm^3	0	0				
Vesifaasi koguruumala (arvutatud)		cm^3					—	—

▼ B

	Tähis	Ühikud	Pimekatse		Pimekatse		Kontroll	
Uuritava aine esialgne kontsentratsioon vesifaasis		$\mu\text{g cm}^{-3}$						

Pärast loksutamist ja tsentrifuugimist

Kontsentratsioon vesifaasis		$\mu\text{g cm}^{-3}$						
-----------------------------	--	-----------------------	--	--	--	--	--	--

Märkus: Vajaduse korral lisada veerge.

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): %

Temperatuur: °C

Massibilanss

	Tähis	Ühikud				
Katseklaas nr						
Kaalutud muld	—	g				
Muld: kuivmass	m_{soil}	g				
Vee ruumala kaalutud mullas (arvutatud)	V_{WS}	ml				
Mulla tasakaalustamiseks kasutatud 0,01 M CaCl_2 lahuse ruumala		ml				
Põhilahuse ruumala		cm^3				
Mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguruumala	V_0	cm^3				
Uuritava lahuse esialgne kontsentratsioon	C_0	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Tasakaaluoleku saabumise aeg	—	h				

Pärast loksutamist ja tsentrifuugimist

Uuritava aine kontsentratsioon vesifaasis tasakaaluolekus, sisaldab pimekatsest tulenevat parandust	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq})$	$\mu\text{g cm}^{-3}$				
Tasakaaluoleku saabumise aeg	t_{eq}	h				

Esimene lahjendamine lahustiga

Eemaldatud vesifaasi ruumala	V_{rec}	cm^3				
Lisatud lahusti ruumala	ΔV	cm^3				

Esimene ekstraheerimine lahustiga

Lahustis analüüsitud signaal	S_{E1}	var.				
Uuritava aine kontsentratsioon lahustis	C_{E1}	$\mu\text{g cm}^{-3}$				

▼B

	Tähis	Ühikud					
Mullast ja anuma seintelt ekstraheeritud aine mass	m_{E1}	μg					
Teine lahjendamine lahustiga							
Eemaldatud lahusti ruumala	ΔV_s	cm^3					
Lisatud lahusti ruumala	$\Delta V'$	cm^3					
Teine ekstraheerimine lahustiga							
Lahustifaasis analüüsitud signaal	S_{E2}	var.					
Uuritava aine kontsentratsioon lahustis	C_{E2}	$\mu\text{g cm}^{-3}$					
Mullast ja anuma seintelt ekstraheeritud aine mass	m_{E2}	μg					
Kahes etapis ekstraheeritud uuritava aine kogumass	m_E	μg					
Massibilanss	MB	%					

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): %

Temperatuur: °C

Adsorptsiooniisotermid

	Tähis	Ühikud							
Katseklaas nr									
Kaalutud muld	—	g							
Muld: kuivmass	E	g							
Vee ruumala kaalutud mullas (arvutatud)	V_{WS}	cm^3							
Mulla tasakaalustamiseks kasutatud 0,01 M CaCl_2 lahuse ruumala		cm^3							
Lisatud põhilahuse ruumala		cm^3							
Mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguruumala (arvutatud)	V_0	cm^3							
Lahuse kontsentratsioon	C_0	$\mu\text{g cm}^{-3}$							
Tasakaaluoleku saabumise aeg	—	h							

▼ B

	Tähis	Ühikud								
Pärast loksutamist ja tseentrifuugimist										
Aine kontsentratsioon vesifaasis, sisaldab pimekatsest tulenevat parandust	$C_{aq}^{ads} (eq)$	$\mu g \text{ cm}^{-3}$								
Temperatuur		$^{\circ}C$								
Mullaühiku kohta adsorbeerunud mass	$C_s^{ads} (eq)$	$\mu g \text{ g}^{-1}$								

Regressioonanalüüs:

 K_F^{ads} väärtus:

1/n väärtus:

regressioonitegur r^2 :

Uuritud aine:

Uuritud muld:

Kuivaine sisaldus mullas (105 °C, 12h): %

Temperatuur: °C

Kasutatud analüüsimetoodika: Kaudne Paralleelne Jada **Desorptsiooni uuring**

	Tähis	Ühikud	Ajava- hemik	Ajava- hemik	Ajava- hemik	Ajava- hemik
Katseklaasi nr, saadakse adsorptsioonietapist						
Mullal adsorbeerunud aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus	$m_s^{ads} (eq)$	μg				
Eemaldatud vesifaasi ruumala, mis asendati 0,01 M $CaCl_2$ -ga	V_R	cm^3				
Mullaga kokkupuutuva vesifaasi koguruumala	PM	V_0	cm^3			
	SM	V_T	cm^3			
Osalisest ruumala asendusest tingitud ülejääva uuritava aine mass adsorptsiooni tasakaaluolekus	m_{aq}^A	μg				

Desorptsiooni kineetika

Mullast desorbeerunud aine mõõdetud mass ajahetkel t_i		$m_m^{des} (t_i)$	μg			
Uuritava aine mõõtmiseks katseklaasist (j) võetud lahuse ruumala	PM	V_f^j	cm^3			
	SM	v_a^D	cm^3			
Mullast desorbeerunud aine mass ajahetkel t_i (arvutatud)		$m_{aq}^{des} (t_i)$	μg			
Mullast ajavahemikus Δt_i desorbeerunud aine mass (arvutatud)		$m_{aq}^{des} (\Delta t_i)$	μg			

▼B

	Tähis	Ühikud	Ajava- hemik	Ajava- hemik	Ajava- hemik	Ajava- hemik
Desorptsiooni protsent						
Desorptsioon ajahetkel t_i	D_{t_i}	%				
Desorptsioon ajavahemikus Δt_i	$D_{\Delta t_i}$	%				
Näiline desorptsioonitegur	K_{des}					

PM: paralleelmeetod

SM: jadameetod

▼B**C.19. ADSORPTSIOONITEGURI (K_{OC}) KINDLAKSMÄÄRAMINE-MULLAS JA REOVEESETTES KÕRGSURVEVEDELIKKROMATOGRAAFIA (HPLC) ABIL****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub OECD juhendist TG 121 (2000).

1.1. SISSEJUHATUS

Ainete sorptsiooni muldadesse ja kanalisatsioonijääkidesse võib kirjeldada parameetrite abil, mida saab katseliselt kindlaks määrata meetodi C.18 abil. Üheks oluliseks parameetrik on adsorptsioonitegur, mida määratletakse kui suhet mullas/reoveesettes oleva aine kontsentratsiooni ja vesifaasis oleva aine kontsentratsiooni adsorptsiooni tasakaalu tingimuste vahel. Mulla orgaanilise süsiniku sisalduse suhtes normaliseeritud adsorptsioonitegur K_{OC} on kasulik näitaja, mis iseloomustab kemikaali seostumisvõimet mulla orgaanilise ainese või reoveesetega ning võimaldab võrrelda erinevaid kemikaale. Seda parameetrit võib hinnata veeslahustuvuse ja n-oktanooli/vee jaotusteguri vaheliste korrelatsioonide abil (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

Käesolevas uuringus kirjeldatud katsemeetodis kasutatakse HPLCd adsorptsiooniteguri K_{OC} määramiseks mullas ja reoveesettes (8). Need näitajad on usaldusväärsemad kui QSAR-arvutustega saadud näitajad (9). Kuna tegemist on hinnangulise meetodiga, ei saa see täielikult asendada katsemeetodis C.18 kasutatud partii tasakaalustamise katseid. Siiski võib kindlaksmääratud K_{OC} väärtust kasutada selleks, et valida sobivad katseparameetrid adsorptsiooni/desorptsiooni uuringute jaoks vastavalt katsemeetodile C.18, arvutades K_d (jaotustegur) või K_f (Freundlichi adsorptsioonitegur) vastavalt võrrandile 3 (vt punkti 1.2).

1.2. MÕISTED

K_d – jaotustegur on lahustunud uuritava aine tasakaalukontsentratsioonide C suhe kahefaasilises süsteemis, mis koosneb sorbendist (muld või reoveesete) ja vesifaasist; see on dimensioonita väärtus, kui kontsentratsioonid mõlemas faasis on väljendatud massiprotsendina. Juhul kui kontsentratsioon vesifaasis esitatakse massi ja ruumala suhtena, on ühikuteks $ml\ g^{-1}$. K_d võib muutuda vastavalt sorbendi omadustele ning sõltuda kontsentratsioonist.

$$K_d = \frac{C_{soil}}{C_{aq}} \text{ OR } \frac{C_{sludge}}{C_{aq}} \quad (1)$$

kus:

C_{soil} = uuritava aine tasakaalukontsentratsioon mullas ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{sludge} = uuritava aine tasakaalukontsentratsioon jääkides ($\mu g \cdot g^{-1}$)

C_{aq} = uuritava aine tasakaalukontsentratsioon vesifaasis ($\mu g \cdot g^{-1}$, ($\mu g \cdot ml^{-1}$)).

▼B

K_f – Freundlichi adsorptsioonitegur on uuritava aine kontsentratsioon mullas või reoveesetis (x/m), kui tasakaalukontsentratsioon C_{aq} vesifaasis on üks; ühikud on $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ sorbenti. Väärtus võib muutuda sõltuvalt sorbendi omadustest.

$$\log \frac{x}{m} = \log K_f + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq} \quad (2)$$

kus:

x/m = sorbendi kogusesse m (g) adsorbeerunud uuritava aine kogus x (μg) tasakaaluolekus

$1/n$ = Freundlichi adsorptsiooniisotermi kõver

C_{aq} = uuritava aine tasakaalukontsentratsioon vesifaasis ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)

$$\text{At } C_{aq} = 1; \log K_f = \log \frac{x}{m}$$

K_{oc} – sorbendi orgaanilise süsiniku sisalduse (f_{oc}) suhtes normaliseeritud aine jaotustegur (K_d) või Freundlichi adsorptsioonitegur (K_f); eriti mitteioniseerumata kemikaalide korral on see ligikaudseks indikaatoriks aine ja sorbendi vahelise adsorptsiooni ulatuse määramisel ning võimaldab võrrelda erinevaid kemikaale. Olenevalt K_d ja K_f mõõtmetest võib K_{oc} olla dimensioonita suurus või omada ühikuid $\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$ või $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ orgaanilist ainet.

$$K_{oc} = \frac{K_d}{f_{oc}} \left(\text{dimensionless or } \text{ml} \cdot \text{g}^{-1} \right) \text{ or } \frac{K_f}{f_{oc}} \left(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \right) \quad (3)$$

K_{oc} ja K_d vaheline suhe ei ole alati lineaarne ja seega võivad K_{oc} väärtused mullati erineda, kuid nende varieerivus on palju väiksem võrreldes K_d või K_f väärtustega.

Adsorptsioonitegur (K_{oc}) tuletatakse võimsustegurist (k'), kasutades kalibriimisgraafikut, milles $\log k'$ esitatakse $\log K_{oc}$ funktsioonina valitud võrdlusühendite kohta.

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (4)$$

kus:

t_R = uuritava aine ja võrdlusaine HPLC peetumisaeg (minutites)

t_0 = HPLC surnud aeg (minutites) (vt punkti 1.8.2).

P_{ow} – oktanooli/vee jaotustegur on n-oktanooli ja vette lahustunud aine kontsentratsioonide suhe, mis on ilma dimensioonita väärtus

$$P_{ow} = \frac{C_{octanol}}{C_{aq}} (= K_{ow}) \quad (5)$$

1.3. VÕRDLUSAINED

Enne meetodi kasutamist peavad olema teada struktuurivalem, puhtus ja dissotsiatsioonikonstant (vajaduse korral). Kasulik on ka teave vees ja orgaanilistes lahustites lahustuvuse, oktanooli/vee jaotusteguri ja hüdrofüüsi omaduste kohta.

▼B

Selleks, et uuritava aine mõõdetud HPLC-retentsioonandmeid saaks korreleerida uuritava aine adsorptsiooniteguri K_{oc} -ga, tuleb joonistada kaliibrimisgraafik, milles $\log K_{oc}$ esitatakse $\log k'$ funktsioonina. Kasutada tuleks minimaalselt kuut võrdluspunkti, millest vähemalt üks on madalam ja üks kõrgem kui uuritava aine eeldatav väärtus. Meetodi täpsus paraneb märgatavalt, kui kasutatakse võrdlusaineid, mis on struktuurilt uuritava ainega seotud. Kui sellised andmed ei ole kättesaadaval, valib kasutaja ise sobivad kaliibrimisained. Sellisel juhul tuleks valida struktuuriliselt heterogeensed ained. Kasutamiseks sobivad ained ja K_{oc} väärtused on esitatud reoveesette puhul liite tabelis 1 ja mulla puhul tabelis 3. Teiste kaliibrimisainete valikut tuleks põhjendada.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

HPLC tehakse analüütilistes kolonnides, mis on täidetud müügilooleva tsüanopropüüli faasiga, mis sisaldab lipofiilseid ja polaarseid struktuuriühikuid. Kasutatakse mõõdukalt polaarset statsionaarset faasi, mis põhineb ränidioksiidmaatriksil:

- O - Si - CH₂ - CH₂ - CH₂ - CN

Ränidioksiid Mittepolaarne spacer-aine Polaarne struktuuriühik

Katsemeetodi põhimõte on sarnane meetodiga A.8 (jaotustegur, HPLC-meetod). Kui uuritav aine läbib kolonni koos liikuva faasiga, reageerib see statsionaarse faasiga. Kuna uuritav aine jaguneb liikuva ja statsionaarse faasi vahel, aeglustub selle liikumine. Kuna statsionaarses faasis on nii polaarseid kui mittepolaarseid osasid, võivad molekulide polaarsed ja mittepolaarsed rühmad reageerida samal viisil kui orgaaniline aines mulla- või reoveesette maatriksites. See võimaldab määrata kolonniga seotud peetumisaja ja orgaanilise ainese adsorptsiooniteguri vahelise suhte.

pH-I on märkimisväärne mõju sorptsioonile, eriti polaarsete ainete puhul. Põllumajandusmaa või reoveepuhastusjaamade mahutite pH on tavaliselt vahemikus pH 5,5–7,5. Ioniseerivate ainete korral tuleks teha kaks uuringut nii ioniseeritud kui ioniseerimata kujul sobivates puhverlahustes, kuid ainult siis, kui vähemalt 10 % katsehenditest dissotsieerub vahemikus pH 5,5–7,5.

Kuna määramisel kasutatakse ainult HPLC-kolonniga seotud peetumisaja ja adsorptsiooniteguri vahelist suhet, ei ole kvantitatiivset analüüsimeetodit tarvis ja määrata tuleb ainult peetumisaeg. Kui kasutatakse sobivaid võrdlusaineid ja katse tingimused on standardised, võimaldab see meetod kiiresti ja efektiivselt määrata adsorptsiooniteguri K_{oc} .

1.5. UURINGU KASUTATAVUS

HPLC-meetod sobib selliste keemiliste ainete jaoks (mürgistamata või mürgistatud), mille jaoks on saadav sobiv tuvastamissüsteem (nt spektrofotomeeter, radioaktiivsuse detektor) ja mis on katse tegemise jooksul piisavalt püsivad. See võib olla eriti kasulik selliste kemikaalide puhul, mida on raske uurida muude katsesüsteemidega (st lenduvad ained; ained, mis ei lahustu vees kontsentratsioonil, mida on võimalik analüütiliselt mõõta; inkubatsioonisüsteemide pinna suhtes suurt afiinsust omavad ained). Meetodit saab kasutada segude puhul, mille korral ei ole võimalik elueerimisribasid eristada. Sellisel juhul tuleks märkida ära uuritavate ainete segu ühendite $\log K_{oc}$ väärtuste ülemine ja alumine piir.

▼B

Lisandid võivad mõnikord põhjustada probleeme HPLC-tulemuste tõlgendamisel, kuid need ei ole väga olulised, kui uuritavat ainet on võimalik analüütiliselt selgelt identifitseerida ja lisanditest eraldada.

See meetod on valideeritud liite tabelis 1 loetletud ainete jaoks ja seda on kasutatud ka paljude teiste kemikaalide puhul, mis kuuluvad järgmistesse kemikaalide klassidesse:

- aromaatsed amiinid (nt trifluraliin, 4-klooraniliin, 3,5-dinitroaniiliin, 4-metüülaniiliin, N-metüülaniiliin, 1-naftüülamiin);
- aromaatsed karboksüülhappe estrid (nt bensoehappe metüülester, 3,5-dinitrobensoehappe etüülester);
- aromaatsed süsivesinikud (nt toluen, ksüleen, etüülbenseen, nitrobenseen);
- arüüloksüfenoksüpropioonhappe estrid (nt diklofop-metüül, fenoksaprop-etüül, fenoksaprop-P-etüül);
- bensimidasool- ja imidasoolfungitsiidid (nt karbentasiim, fuberidasool, triasoksiid);
- karboksüülhappe amiidid (nt 2-klorobensamiid, N,N-dimetüülbensamiid, 3,5-dinitrobensamiid, N-metüülbensamiid, 2-nitrobensamiid, 3-nitrobensamiid);
- klooritud süsivesinikud (nt endosulfaan, DDT, heksaklorobenseen, kintoseen, 1,2,3-triklorobenseen);
- orgaanilist fosforit sisaldavad insektiitsiidid (nt metüülasiinfoss, disulfotoon, fenamifoss, isofeenfoss, pürasofoss, sulprofoss, triasofoss);
- fenoolid (nt fenool, 2-nitrofenool, 4-nitrofenool, pentaklorofenool, 2,4,6-triklorofenool, 1-naftool);
- fenüülkarbamiidi derivaadid (nt isoproturoon, monolinuroon, pentsükuroon);
- värvained (nt Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81);
- polüaromaatsed süsivesinikud (nt atsenafteen, naftaleen);
- 1,3,5-triasiinherbitsiidid (nt prometrüün, propasiin, simasiin, terbutrüün);
- triasooli derivaadid (nt tebukonasool, triadimefoon, tradimenool, triapentenool).

Meetodit ei kasutata ainete puhul, mis reageerivad kas eluendi või statsionaarse faasiga. Samuti ei kasutata seda ainete puhul, mis reageerivad spetsiifilisel viisil anorgaaniliste ühenditega (nt moodustavad klasterkomplekse savimineraalidega). Meetod ei pruugi toimida ka pindaktiivsete ainete, anorgaaniliste ühendite ja mõõdukalt tugevate või tugevate orgaaniliste hapete ja aluste korral. Kindlaks võib määrata $\log K_{oc}$ väärtused vahemikus 1,5–5,0. Tuleb määrata ioniseeruvad ained, kasutades puhverdatud liikuvat faasi, kuid hoolitseda tuleb selle eest, et puhvri komponendid ega uuritav aine ei sadestuks.

▼B

1.6. KVALITEEDIKRITERIUMID

1.6.1. Täpsus

Tavaliselt saab uuritava aine adsorptsiooniteguri määrata täpsusega $\pm 0,5$ logaritmiühikut perioodilise tasakaalu meetodiga määratud väärtusest (vt liites olevat tabelit 1). Suurema täpsuse võib saavutada, kui kasutatakse võrdlusaineid, mis on struktuurilt uuritava ainega seotud.

1.6.2. Korratavus

Määramised tuleks teha vähemalt kaks korda. Individuaalsetest määramistest tuletatud $\log K_{oc}$ väärtused peaksid jääma vahemikku 0,25 logaritmiühikut.

1.6.3. Reprodutseeritavus

Meetodi kasutamisest saadud kogemused toetavad selle valiidsust. HPLC-meetodi uurimine, milles kasutati 48 ainet (enamasti pestitsiidid), mille kohta on olemas usaldusväärsed mulla K_{oc} kohta käivad andmed, andis korrelatsioonikordaja $R = 0,95$ (10, 11).

Meetodi tõhustamiseks ja valideerimiseks viidi läbi laboratooriumi-devaheline võrdlusuuring, milles osales 11 laboratooriumi (12). Tulemused on esitatud liite tabelis 2.

1.7. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.7.1. Adsorptsiooniteguri esialgne määramine

Oktanooli/vee jaotustegurit P_{ow} ($= K_{ow}$) ja teatud ulatuses ka vees lahustuvust saab kasutada adsorptsiooni ulatuse indikaatoritena, eriti ioniseerimata ainete korral, ja seega kasutada esialgse ulatuse leidmiseks. Paljude kemikaalide rühmade kohta on avaldatud mitmeid kasulikke korrelatsioone (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7).

1.7.2. Seadmed

Vajalik on mittepulseeriva pumba ja sobiva tuvastamiseseadmega vedelikkromatograafi olemasolu. Soovitatakse kasutada klapp-pihustit, millel on sisestus silmus. Kasutatakse müügilolevaid räni-dioksiidist alusega tsüanopropüülsidemega seotud vaike (nt Hypersil ja Zorbax CN). Sama aine juhtkolonni võib asetada sisestussüsteemi ja analüütilise kolonni vahele. Erinevate tarnijate kolonnid võivad oma eraldamise efektiivsuse suhtes märkimisväärselt varieeruda. Juhisena tuleks üritada saavutada järgmised võimsustegurid k' : $\log k' > 0,0$, kui $\log K_{oc} = 3,0$, ja $\log k' > -0,4$, kui $\log K_{oc} = 2,0$, kasutades metanooli/vee suhet 55/45 % liikuva faasina.

1.7.3. Liikuvad faasid

Uuritud on mitmeid liikuvaid faase ja soovitatakse kahte järgmist:

— metanool/vesi (55/45 mahuprotsenti);

— metanool/0,01 M tsitraatpuhver pH 6,0 (55/45 mahuprotsenti).

▼B

Elueerimislahusti valmistamiseks tuleb kasutada HPLC-puhast metaanooli ja destilleeritud vett või tsitraatpuhvrit. Enne kasutamist segub degaseeritakse. Kasutada tuleb isokraatilist elueerimist. Kui metanooli/vee segud ei sobi, võib kasutada teisi orgaanilise lahusti ja vee segusid, näiteks etanooli ja vee segu või atsetonitrili ja vee segu. Ioniseeruvate ühendite korral soovitatakse kasutada puhverlahust pH stabiliseerimiseks. Tuleb hoolitseda selle eest, et sool ei ladestatu ja kolonn ei mandu, mida võib mõningate orgaaniliste faaside/puhversegude korral esineda.

Kasutada ei tohi mingeid lisaaineid, nagu näiteks ioonpaari reaktiive, sest need võivad mõjutada statsionaarse faasi sorptsiooni omadusi. Sellised statsionaarse faasi muutused võivad olla pöördumatud. Seetõttu on kohustuslik lisaaineid kasutada katsed viia läbi eraldi kolonnides.

1.7.4. **Soluudid**

Uuritavad ained ja võrdlusained tuleks lahustada liikuvus faasis.

1.8. KATSE KÄIK

1.8.1. **Katsetingimused**

Temperatuur mõõtmiste kestel tuleks dokumenteerida. Väga soovitatav on kasutada reguleeritava temperatuuriga kolonni, et tagada püsivad tingimused kaliibrimise ja hindamise katsete jooksul ning uuritava aine määramisel.

1.8.2. **Surnud aja t_0 määramine**

Surnud aja t_0 määramiseks võib kasutada kahte erinevat meetodit (vt ka punkti 1.2).

1.8.2.1. *Surnud aja t_0 määramine, kasutades homoloogilist rida*

See menetlus on andnud usaldusväärseid ja standardiseeritud t_0 väärtusi. Üksikasju vt katsemeetodit käsitlevas punktis A.8: jaotustegur (n-oktaanool/vesi), HPLC-meetod.

1.8.2.2. *Surnud aja t_0 määramine inertsete ainete abil, mis ei jää kolonni*

See tehnika põhineb formamiidi, karbamiidi või naatriumnitraadi lahuste lisamisel. Määramisi tuleks teha vähemalt kaks korda.

1.8.3. **Peetumisaegade t_R määramine**

Võrdlusained tuleks valida punktis 1.3 kirjeldatud viisil. Need võib sisestada segastandardina peetumisaegade kindlaksmääramiseks, tingimusel, et on tõendatud, et ühegi võrdlus standardi peetumisaega ei mõjuta teiste võrdlusstandardite juuresolek. Kaliibrimine tuleks teha korrapäraste ajavahemike tagant vähemalt kaks korda päevas, et oleks võimalik seletada kolonni tulemuste ootamatuid muutusi. Kaliibrimissisestused soovitatakse teha enne ja pärast uuritava aine sisestamist, et saada kinnitust selle kohta, et peetumisaeg ei ole muutunud. Uuritavad ained sisestatakse eraldi võimalikult väikestes kogustes (et vältida kolonni ülekoormust) ning nende peetumisaegad määratakse kindlaks.

▼B

Määramiste usaldusväärsuse suurendamiseks tuleb need teha vähemalt kaks korda. Individuaalsetest mõõtmistest tuletatud $\log K_{oc}$ väärtused peaksid jääma vahemikku 0,25 logaritmiühikut.

1.8.4. **Hindamine**

Võimsustegurid k' arvutatakse valitud võrdlusainete surnud aja t_0 ja peetumisaegade t_R põhjal vastavalt võrrandile 4 (vt punkti 1.2). Seejärel joonistatakse graafik, milles võrdlusainete $\log k'$ andmed esitatakse liite tabelites 1 ja 3 toodud partii tasakaalustamise katsetest saadud vastavate $\log K_{oc}$ väärtuste funktsioonina. Selle graafiku abil kasutatakse uuritava aine $\log k'$ väärtust selle $\log K_{oc}$ väärtuse määramiseks. Kui tegelikud tulemused näitavad, et uuritava aine $\log K_{oc}$ on väljaspool kaliibrimisvahemikku, tuleks uuringut korrata, kasutades erinevaid, sobivamaid võrdlusaineid.

2. **ANDMED JA ARUANDLUS**

Aruanne peab sisaldama järgmist teavet:

- uuritavate ainete ja võrdlusainete identsus ja puhtus ning vajaduse korral pK_a väärtused;
- seadmete ja tegevustingimuste kirjeldus, nt analüütilise (ja juht-) kolonni tüüp ja mõõtmed, tuvastamisvahendid, liikuv faas (komponentide suhe ja pH), temperatuuri vahemik määramiste jooksul;
- surnud aeg ja selle määramiseks kasutatud meetod;
- kolonni viidud uuritavate ainete ja võrdlusainete kogused;
- kaliibrimiseks kasutatud võrdlustühendite peetumisajad;
- joonestatud regressioonigraafiku ($\log k'$ vs $\log K_{oc}$) üksikasjalikud andmed ja graafik ise;
- uuritud ühendi keskmised peetumisandmed ja määratud $\log K_{oc}$ väärtus;
- kromatogrammid.

3. **VHITED**

- 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, pp. 1050–1059.
- 4) C T. Chiou, P. E. Porter, D.W. Schmedding (1983). Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. Environ. Sci. Technol., 17, pp. 227–231.
- 5) Z. Gerstl, U. Mingelgrin (1984). Sorption of organic substances by soils and sediment. J. Environm. Sci. Health, B19, pp. 297–312.

▼B

- 6) C. T. Chiou, L. J. Peters, V. H. Freed (1979). A physical concept of soil water equilibria for nonionic organic compounds, *Science*, 106, pp. 831–832.
- 7) S. W. Karickhoff (1981). Semi-empirical estimation of sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments and soils. *Chemosphere*, 10, pp. 833–846.
- 8) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. *Chemosphere*, 35-(1/2), pp. 121–128.
- 9) M. Mueller, W. Kördel (1996). Comparison of screening methods for the estimation of adsorption coefficients on soil. *Chemosphere*, 32(12), pp. 2493–2504.
- 10) W. Kördel, J. Stutte, G. Kotthoff (1993). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient in soil-comparison of different stationary phases, *Chemosphere*, 27(12), pp. 2341–2352.
- 11) B. von Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Sorption of nonpolar and polar compounds to soils: Processes, measurements and experience with the applicability of the modified OECD Guideline 106, *Chemosphere*, 22, pp. 285–304.
- 12) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil-results of a ring test. *Chemosphere*, 30(7), pp. 1373–1384.



liide

Tabel 1

Muldade ja reoveesette K_{oc} väärtuste ja HPLC-sõelumismeetodi alusel arvatud väärtuste võrdlus ⁽¹⁾/⁽²⁾

Aine	CASi nr	log K_{oc} reoveesete	log K_{oc} HPLC	Δ	log K_{oc} mullad	log K_{oc} HPLC	Δ
Atrasiin	1912-24-9	1,66	2,14	0,48	1,81	2,20	0,39
Linuroon	330-55-2	2,43	2,96	0,53	2,59	2,89	0,30
Fentioon	55-38-9	3,75	3,58	0,17	3,31	3,40	0,09
Monuroon	150-68-5	1,46	2,21	0,75	1,99	2,26	0,27
Fenantreen	85-01-8	4,35	3,72	0,63	4,09	3,52	0,57
Bensoehappe fenüülester	93-99-2	3,26	3,03	0,23	2,87	2,94	0,07
Bensamiid	55-21-0	1,60	1,00	0,60	1,26	1,25	0,01
4-nitrobensamiid	619-80-7	1,52	1,49	0,03	1,93	1,66	0,27
Atsetaniliid	103-84-4	1,52	1,53	0,01	1,26	1,69	0,08
Aniliin	62-53-3	1,74	1,47	0,27	2,07	1,64	0,43
2,5-dikloroaniliin	95-82-9	2,45	2,59	0,14	2,55	2,58	0,03

⁽¹⁾ W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35(1/2), 121-128.

⁽²⁾ W. Kördel, D. Hennecke, C. Franke (1997). Determination of the adsorption-coefficients of organic substances on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 107-119.

Tabel 2

HPLC-meetodi tõhustamiseks ja valideerimiseks tehtud laboratooriumidevahelise võrdlusuuringu (11 laboratooriumi osalusel) tulemused ⁽¹⁾

Aine	CASi nr	log K_{oc} (OECD 106)	K_{oc}	log K_{oc}
		[HPLC-meetod]	[HPLC-meetod]	
Atrasiin	1912-24-9	1,81	78 ± 16	1,89
Monuroon	150-68-5	1,99	100 ± 8	2,00
Triapentenool	77608-88-3	2,37	292 ± 58	2,47
Linuroon	330-55-2	2,59	465 ± 62	2,67
Fentioon	55-38-9	3,31	2062 ± 648	3,31

⁽¹⁾ W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil- results of a ring test. Chemosphere, 30(7), 1373-1384.



Tabel 3

Mulla adsorptsiooni käsitlevatel andmetel põhineva HPLC-sõelumismeetodi jaoks soovitatavad võrdlusained

Võrdlusained	CASi nr	Partii tasakaaluolekust saadud log K _{oc} keskmised väärtused	K _{oc} andmete number	log S.D.	Allikas
Atseetaniliid	103-84-4	1,25	4	0,48	(a)
Fenool	108-95-2	1,32	4	0,70	(a)
2-Nitrobensamiid	610-15-1	1,45	3	0,90	(b)
N, N-dimetüülbensamiid	611-74-5	1,52	2	0,45	(a)
4-metüülbensamiid	619-55-6	1,78	3	1,76	(a)
Metüülbensoaat	93-58-3	1,80	4	1,08	(a)
Atrasiin	1912-24-9	1,81	3	1,08	(c)
Isoproturoon	34123-59-6	1,86	5	1,53	(c)
3-nitrobensamiid	645-09-0	1,95	3	1,31	(b)
Aniliin	62-53-3	2,07	4	1,73	(a)
3,5-dinitrobensamiid	121-81-3	2,31	3	1,27	(b)
Karbentasiim	10605-21-7	2,35	3	1,37	(c)
Triadimenool	55219-65-3	2,40	3	1,85	(c)
Triasoksiid	72459-58-6	2,44	3	1,66	(c)
Triasofoss	24017-47-8	2,55	3	1,78	(c)
Linuroon	330-55-2	2,59	3	1,97	(c)
Naftaleen	91-20-3	2,75	4	2,20	(a)
Endosulfaandiool	2157-19-9	3,02	5	2,29	(c)
Metiokarb	2032-65-7	3,10	4	2,39	(c)
Acid Yellow 219	63405-85-6	3,16	4	2,83	(a)
1,2,3-triklorobenseen	87-61-6	3,16	4	1,40	(a)
y-HCH	58-89-9	3,23	5	2,94	(a)
Fentioon	55-38-9	3,31	3	2,49	(c)
Direct Red 81	2610-11-9	3,43	4	2,68	(a)
Pürasofoss	13457-18-6	3,65	3	2,70	(c)
α-endosulfaan	959-98-8	4,09	5	3,74	(c)
Diklofop-metüül	51338-27-3	4,20	3	3,77	(c)
Fenantreen	85-01-8	4,09	4	3,83	(a)
Basic Blue 41 (segu)	26850-47-5	4,89	4	4,46	(a)
	12270-13-2				
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 01044 (1994)

(b) B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein (1991). Chemosphere, 22, pp. 285-304.

(c) Tööstusest saadud andmed.

▼B**C.20. HIIDKIIVRIKU (*DAPHNIA MAGNA*) SIGIVUSE KATSE****1. MEETOD**

Käesolev sigivust kahjustava toksilisuse katse lähtub OECD juhendist TG 211 (1998).

1.1. SISSEJUHATUS

Katse põhieesmärk on hinnata kemikaalide mõju *Daphnia magna* sigivusele.

1.2. MÕISTED JA ÜHIKUD

Vanemad – katse alguse juures olevad emased kiivrikud, kelle sigivuse uurimine on katse eesmärk.

Järglane – noored kiivrikud, kelle vanemad on katse jooksul ilmale toonud.

Vähim toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) – madalaim uuritud kontsentratsioon, mille puhul on ainel kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt märkimisväärne mõju sigivusele ja vanemate suremusele ($p < 0,05$). Kõigil LOECst suurematel uuritavatel kontsentratsioonidel on siiski kahjulik mõju, mis on samaväärne või suurem kui LOEC korral täheldatav mõju. Kui neid kaht tingimust ei ole võimalik täita, tuleb esitada selgitus selle kohta, kuidas LOEC (ja sellest tulenevalt ka NOEC) on valitud.

Katsealustele organismidele täheldatavat toimet mitte avaldav kontsentratsioon (NOEC) – LOECst vahetult madalam uuritud kontsentratsioon, millel ei ole kindlaksmääratud kokkupuuteaja jooksul kontrollrühmaga võrreldes statistiliselt märkimisväärset mõju ($p < 0,05$).

EC_x – vees lahustatud uuritava aine kontsentratsioon, mis põhjustab kiivrike sigivuse vähenemist kokkupuuteaja jooksul x %.

Sisemise kasvu määr – populatsiooni kasvu määr, milles ühendatakse sigivus ja easpetsiifiline suremus (20, 21, 22). Stabiilsetes populatsioonides on see null. Kasvavate populatsioonide puhul on see positiivne ja kahanevate populatsioonide puhul negatiivne. Kahanevad populatsioonid ei ole ilmselt jätkusuutlikud ja surevad välja.

Avastamispiir – madalaim kontsentratsioon, mille olemasolu on võimalik avastada, kuid mille kogust ei saa kindlaks määrata.

Määramispiir – madalaim kontsentratsioon, mille koguse saab kindlaks määrata.

Suremus – loom loetakse surnuks, kui ta ei liiguta, st ei suuda ujuda, või kui 15 sekundit pärast katseanuma õrna liigutamist ei ole võimalik täheldada tundlate ja tagakeha liikumist. (Kui kasutatakse teistsugust määratlust, tuleb sellest teatada koos vajalike viidetega.)

▼B

1.3. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Noored emased kiivrikud (vanemad), kes on katse alguses alla 24 tunni vanad, viiakse kokku veele lisatud uuritava ainega erinevates kontsentratsioonides. Katse kestab 21 päeva. Katse lõpus hinnatakse iga katse lõpus elus oleva vanema kohta saadud elus järglaste koguarvu. See tähendab, et saadud noorloomi, kes katse käigus surevad, ei arvestata. Vanemate sigivust saab väljendada ka muul moel (nt looma kohta päevas saadud elusate järglaste arv alates esimesest päevast, mil järglaste olemasolu märgati), kuid need tuleks edastada lisaks katse lõpus elus oleva vanema kohta saadud noorloomade koguarvule. Uuritava ainega kokkupuutunud loomade sigivust võrreldakse kontrollrühma(de) omaga, et teha kindlaks vähim toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC) ja selle põhjal ka täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC). Lisaks sellele analüüsitakse andmeid võimaluse korral regressioonimudeli abil, et hinnata kontsentratsiooni, mis põhjustaks sigivuse vähenemise x % (st EC_{50} , EC_{20} või EC_{10}).

Andmed tuleb esitada ka vanemate ellujäämise ja esimeste järglaste saamise aja kohta. Uurida võib ka muid ainega seotud mõjusid loomade näitajatele, näiteks kasvule (pikkus), ja võimaluse korral ka sisemise kasvu määra.

1.4. TEAVE UURITAVA AINE KOHTA

Olemas peaksid olema andmed hiidkiivrikuga tehtud ägeda toksilise katse kohta (vt meetod C.2, I osa). Tulemused võivad aidata valida sigivust puudutavate katsete jaoks sobivaid uuritavate kontsentratsioonide vahemikke. Teada peaksid olema uuritava aine lahustuvus vees ja aururõhk ning olemas peaks olema usaldusväärne analüütiline meetod, mille abil määrata kindlaks aine kogus uuritavas lahuses ja mille kohta on teada tulemuslikkus ja määramispiir.

Katsetingimuste kindlaksmääramisel võib olla kasulik järgmine uuritavat ainet puudutav teave: struktuurivalem, aine puhtus, püsivus valguse käes, püsivus katsetingimustes, pK_a , P_{ow} ja katse tulemused seoses biolagunduvusega (vt meetod C.4).

1.5. KATSE VALIIDUSUS

Katse valiidsuse kohta kehtivad järgmised tingimused (kontrollrühmades):

- vanemate (emaste kiivrike) suremus ei ületa katse lõpus 20 %;
- katse lõpus elus oleva vanema kohta saadud elusate järglaste keskmine arv on ≥ 60 .

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. Seadmed

Katseanumad ja muud seadmed, mis puutuvad kokku uuritava lahustega, peaksid olema üleni klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist. Katseanumad on tavaliselt klaasist keeduklaasid.

Lisaks võib vaja minna veel järgmisi vahendeid:

- hapnikumõõdja (mikroelektroodi või muu sobiva seadmega, mis võimaldaks mõõta lahustunud hapnikku väikese ruumalaga proovides);

▼B

- temperatuuri reguleerimiseks vajalikud seadmed;
- pH-meeter;
- seadmed vee kareduse määramiseks;
- seadmed vee summaarse orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks või seadmed keemilise hapnikutarbe määramiseks;
- sobivad seadmed valgusrežiimi kontrollimiseks ja valguse intensiivsuse mõõtmiseks.

1.6.2. Katsealune organism

Katses kasutatav liik on *Daphnia magna* Straus. Muid *Daphnia* liike võib kasutada tingimusel, et nad vastavad vajalikele valiidsuskriteeriumidele (kontrollrühma sigivusega seotud valiidsuskriteerium peaks olema *Daphnia* liikidele iseloomulik). Kui kasutatakse muid *Daphnia* liike, tuleb nad selgelt identifitseerida ja nende kasutamine põhjendada.

Eelistatavalt tuleks kloon identifitseerida genotüübi määramise teel. Teadusuuringud (1) on näidanud, et klooni A (pärit IRCHAst Prantsusmaalt) (3) sigivuse puhul on keskmine valiidsuskriteerium järjekindlalt ≥ 60 järglast ellujäänud vanema kohta, kui kultiveerimine toimub käesoleva meetodi tingimuste kohaselt. Vastuvõetav on ka muude kloonide kasutamine, kui tõendatakse, et kiivriku kultuur vastab katse valiidsuskriteeriumidele.

Katse alguses ei tohi loomad olla üle 24 tunni vanad ning nad ei tohi olla esimese haudme järglased. Loomad peaksid olema terved (st neil ei tohi olla selliseid stressi tunnuseid nagu kõrge suremus, isaste ja rümpade esinemine, esimese haudme saamise viibimine, loomade värvuse muutumine jms). Loomi tuleks säilitada katsetingimustega sarnastes kultiveerimistingimustes (valgus, temperatuur, katsevedelik, söötmine ja loomade arv ühikuruumala kohta). Kui katses kasutatakse kiivriku kultiveerimise keskkond erineb keskkonnast, mida kasutatakse kiivriku rutiinse kultiveerimise puhul, on hea tava kasutada vanemate stressi vältimiseks enne katset tavaliselt umbes kolme nädala pikkust (st üks põlvkond) aklimatiseerimisperioodi.

1.6.3. Katsekeskkond

Kõnealusel katses on soovitatav kasutada täielikult määratletud keskkonda. See aitab vältida raskesti iseloomustatavate lisaainete (nt merevetikad, mullaekstraktid jms) kasutamist ja parandab seega laborivahelise standardimise võimalusi. On leitud, et selleks otstarbeks sobivad keskkonnad on Elendt M4 (4) ja M7 (vt 1. liidet). Eeldusel, et kiivrikukultuur vastab katse valiidsuskriteeriumidele, on vastuvõetavad siiski ka muud keskkonnad (nt 5, 6).

Kui kasutatakse määratlemata lisaaineid sisaldavat keskkonda, tuleb need lisaained selgelt määratleda ning katsearuandes tuleks esitada teave koostise ja eelkõige süsinikusisalduse kohta, sest see võib toetada toiduvalikut. Soovitatav on kindlaks määrata orgaanilise lisaaine põhilahuse summaarne orgaanilise süsiniku sisaldus ja/või keemiline hapnikutarve ja hinnata sellest tulenev panus summaarses orgaanilises süsiniku sisalduses/keemilises hapnikutarbes katsekeskkonnas. Keskkonna summaarse orgaanilise süsiniku sisalduse tase (enne vetikate lisamist) võiks olla madalam kui 2 mg/l (7).

▼B

Kui uuringud tehakse metalle sisaldavate ainetega, on oluline meeles pidada, et katsekeskkonna omadused (nt karedus, kelaatimisvõime) võivad mõjutada uuritava aine toksilisust. Seepärast on soovitatav kasutada täpselt määratletud keskkonda. Praegu on ainsad täpselt määratletud keskkonnad, mis teadaolevalt sobivad *Daphnia magna* pikaajaliseks kultiveerimiseks, Elendt M4 ja M7. Mõlemad keskkonnad sisaldavad kelaativat ainet EDTA. Töö on näidanud (2), et kui sigivust puudutav katse sooritatakse M4 ja M7 keskkonnas, on kaadmiumi „näiline mürgisus“ üldiselt madalam katsekeskkonna puhul, milles puudub EDTA. Seepärast ei soovitata M4 ja M7 kasutada uuringute tegemiseks metalle sisaldavate ainetega ning vältida tuleks ka muid keskkondi, mis sisaldavad teadaolevaid kelaatavaid aineid. Metallide sisaldavate ainete puhul on soovitatav kasutada alternatiivset keskkonda, näiteks ASTMi taastatud karedat magedat vett (7), mis ei sisalda EDTA-d ja millele on lisatud vetikaekstrakti (8). Kõnealune ASTMi taastatud kareda mageda vee ja vetikaekstrakti kombinatsioon on sobiv ka hiidkiivriku pikaajaliseks kultiveerimiseks ja uuringute tegemiseks (2), kuigi lisatud vetikaekstrakti orgaanilise komponendi tõttu võib sellel olla kergelt kelaativ toime.

Katse alguses ja selle jooksul peaks lahustunud hapniku sisaldus olema üle 3 mg/l. pH peaks olema vahemikus 6–9 ning tavaliselt ei tohiks see ühe katse jooksul kõikuda rohkem kui 1,5 ühikut. Soovitatav karedus on üle 140 mg/l (väljendatud CaCO₃). Kõnealusel tasemel tehtud katsete puhul on sigivus olnud vastavuses valiidsuskriteeriumidega (9, 10).

1.6.4. Uuritavad lahused

Valitud kontsentratsiooniga uuritavad lahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks on soovitatav lahustada aine katsekeskkonnas.

Mõningatel juhtudel tuleb piisava kontsentratsiooniga põhilahuse saamiseks kasutada orgaanilisi lahusteid või dispergaatoreid, kuid selliste materjalide kasutamist tuleks igati vältida. Sobivad lahustid on näiteks atsetoon, etanool, metanool, dimetüülformamiid ja trietüüleenglikool. Sobivad dispergaatorid on näiteks Cremophor RH 40, 0,01 % metüülselluloos ja HCO-40. Mingil juhul ei tohiks uuritava aine hulk uuritavates lahustes ületada lahustuvuse piiri katsekeskkonnas.

Lahusteid kasutatakse selleks, et saada põhilahus, mida on võimalik täpselt vette annustada. Kui lahusti kontsentratsioon lõplikus katsekeskkonnas on soovitataval tasemel (st $\leq 0,1$ ml/l), ei ole eespool loetletud lahustid toksilised ega suurenda aine lahustuvust vees.

Dispergaatorid võivad kaasa aidata täpsele annustamisele ja dispergeerimisele. Kui dispergaatori kontsentratsioon lõplikus katsekeskkonnas on soovitataval tasemel ($\leq 0,1$ ml/l), ei ole eespool loetletud dispergaatorid toksilised ega suurenda aine lahustuvust vees.

▼B

1.7. KATSE KAVANDAMINE

Uuritava aine jaotamine katseanumatesse ja katseanumate hilisem käitlemine peaks toimuma korrapäratult. Kui nii ei tehta, võib see põhjustada nihke, mida võib tõlgendada kontsentratsiooni mõjuna. Eelkõige juhul, kui katseühikuid käideldakse jaotamise või kontsentratsiooni järjekorras, võib mõni ajaga seotud tegur, näiteks uuringu läbiviija väsimus või muu viga, põhjustada suurema kontsentratsiooni korral tugevamaid mõjusid. Kui katse tulemusi võivad mõjutada tingimused katse alguses või keskkonnatingimused, näiteks asukoht laboris, tuleks kaaluda katse katkestamist.

1.8. KATSE KÄIK

1.8.1. **Kokkupuutetingimused**1.8.1.1. *Kestus*

Katse kestab 21 päeva.

1.8.1.2. *Laadimine*

Vanemad jaotatakse üksikshaaval katseanumatesse üks loom anuma kohta, kus on 50–100 ml katsevedelikku.

Vahel võib uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks kasutatava analüütilise menetluse nõuete täitmiseks kasutada suuremaid koguseid, kuid lubatud on ka dubleerivate proovide kogumine keemilise analüüsi jaoks. Kui kasutatava katsevedeliku ruumala on üle 100 ml, võib kiivrikutele antava toidu hulka suurendada, et tagada piisava toidu olemasolu ja vastavus valiidsuskriteeriumidele. Läbivoolukatsete korral võib tehnilistel põhjustel kaaluda teistsugust uuringu kavandamist (nt neli kümnekiivrikulist rühma suuremas katseruumalas), kuid kõigist uuringu plaani muudatustest tuleks teatada.

1.8.1.3. *Loomade arv*

Poolstaatiliste katsete puhul vähemalt 10 eraldi peetavat looma iga uuritava kontsentratsiooni kohta ja vähemalt 10 eraldi peetavat looma kontrollrühmas.

Läbivoolukatsete korral on osutunud sobivaks 40 looma kasutamine, kes on jagatud nelja kümneliikmelisse rühma iga uuritava kontsentratsiooni kohta (1). Kasutada võib ka väiksemat katsealuste organismide hulka ning soovitatav on kontsentratsiooni kohta vähemalt 20 looma, kes on jagatud kahe või enama võrdse loomade arvuga dubleeriva proovi vahel (nt neli dubleerivat proovi, igas neist viis kiivrikut). Tuleb märkida, et kui loomi peetakse rühmadena, ei saa sigivust väljendada iga katse lõpus elus oleva vanema kohta saadud elus järglaste koguarvuna, juhul kui vanemad surevad. Sellistel juhtudel tuleks sigivust väljendada katse alguses elus olnud iga vanema kohta saadud elus järglaste koguarvuna.

1.8.1.4. *Söötmine*

Poolstaatiliste katsete puhul peaks kiivrikke söötma iga päev ning soovitatavalt vähemalt kolm korda nädalas (st vastavalt katsekeskkonna vahetusele). Kõrvalekalletest (nt läbivoolukatsete korral) tuleks teatada.

▼B

Katse jooksul peaksid vanemate söödavaliku moodustama peamiselt ühe või mitme järgmise vetikaliigi elusad rakud: *Chlorella* sp., *Sele-nastrum capricornutum* (nüüd *Pseudokirchneriella subcapitata* (11)) ja *Scenedesmus subspicatus*. Söödavaliku aluseks peaks olema igale vanemale pakutava orgaanilise süsiniku (C) kogus. Teadusuuringud (12) on näidanud, et hiidkiivrikute puhul on annus 0,1–0,2 mg süsinikku kiivriku kohta päevas piisav, et saada katse valiidsuskriteeriumide täitmiseks vajalik arv järglasi. Sööta võib anda püsiva kogusena kogu katseperioodi jooksul või soovi korral võib alguses kasutada väiksemat kogust, mida siis katse käigus suurendatakse, et võtta arvesse vanemate kasvamist. Sellisel juhul peaks sööda kogus jääma siiski soovitatava annuse piiresse 0,1–0,2 mg süsinikku kiivriku kohta päevas kogu katse vältel.

Kui nõutava annuse söötmisel kasutatakse asendusmeetmeid, näiteks vetikarakkude arvu või valguse neeldumist (näiteks lihtsustamise huvides, kuna süsinikusisalduse mõõtmine on aeganõudev), peab iga laboratoorium koostama oma nomogrammi, millelt oleks näha asendusmeetme ja vetikakultuuri süsinikusisalduse seos (nõuandeid nomogrammi koostamise kohta vt 2. liidet). Nomogramme tuleks kontrollida vähemalt kord aastas ja juhul, kui vetikakultuuri tingimused on muutunud, siis tihemini. On leitud, et süsinikusisalduse puhul on parem kasutada valguse neeldumist kui rakkude arvu (13).

Selleks, et minimeerida vetikakultuuri keskkonna sattumine katseanumatesse, tuleks kiivrikuid sööta kontsentreeritud vetikasuspensiooniga. Vetikaid saab kontsentreerida tsentrifuugimisega, millele järgneb resuspensioon destilleeritud vees, deioniseeritud vees või kiivrikute kasvukeskkonnas.

1.8.1.5. *Valgus*

16 tundi valgust, mille intensiivsus ei ole suurem kui 15–20 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

1.8.1.6. *Temperatuur*

Katsekeskkonna temperatuur peaks olema vahemikus 18–22 °C. Ühe individuaalse katse puhul ei tohiks temperatuur nimetatud piirides võimaluse korral siiski kõikuda rohkem kui 2 °C (st 18–20, 19–21 või 20–22 °C). Temperatuuri jälgimiseks võib olla otstarbekas kasutada täiendavat katseanumat.

1.8.1.7. *Õhustus*

Katseanumaid ei tohi katse käigus õhustada.

1.8.2. **Uuritav kontsentratsioon**

Tavaliselt peaks kasutama vähemalt viit uuritavat kontsentratsiooni geomeetrilises jadas, mille eraldustegur ei tohiks soovitatavalt olla suurem kui 3,2, ning iga uuritava kontsentratsiooni puhul tuleks kasutada sobivat arvu dubleerivaid proove (vt punkti 1.8.1.3). Vähema kui viie kontsentratsiooni kasutamine tuleb põhjendada. Aineid ei tohiks uurida, kui kontsentratsioon katsekeskkonnas on kõrgem kui nende lahustuvuse piir.

▼B

Kontsentratsioonivahemike määramisel tuleks meeles pidada järgmist:

- i) kui eesmärk on määrata kindlaks LOEC/NOEC, peab madalaim uuritav kontsentratsioon olema piisavalt madal, et sigivus sellise kontsentratsiooni juures ei oleks märkimisväärselt madalam kui kontrollrühmas. Vastupidisel juhul tuleb katset korrata väiksema madalaima kontsentratsiooniga;
- ii) kui eesmärk on määrata kindlaks LOEC/NOEC, peab kõrgeim katsekonsentratsioon olema piisavalt kõrge, et sigivus sellise kontsentratsiooni juures oleks märkimisväärselt madalam kui kontrollrühmas. Vastupidisel juhul tuleb katset korrata suurema kõrgeima kontsentratsiooniga;
- iii) kui hinnatakse EC_X mõju sigivusele, on soovitatav kasutada kontsentratsioone, mis oleksid piisavad, et määratleda EC_X vajalikul usaldusväärsuse tasemel. Kui hinnatakse EC_{50} mõju sigivusele, on soovitatav, et kõrgeim uuritav kontsentratsioon oleks suurem kui kõnealune EC_{50} . Kuigi vastupidisel juhul on võimalik hinnata EC_{50} , on EC_{50} usaldusvahemik väga suur ning kasutatud mudeli adekvaatsuse hindamine rahuldaval moel ei pruugi olla võimalik;
- iv) uuritavate kontsentratsioonide vahemik ei tohiks hõlmata kontsentratsioone, millel on statistiliselt märkimisväärne mõju täiskasvanud isendite eluspüsimisele, kuna sellisel juhul ei uurita selle katsega enam mitte ainult sigivust, vaid sigivuse ja suremuse kombinatsiooni, ning see eeldaks palju keerukama statistilise analüüsi kasutamist.

Eelnevad teadmised uuritava aine toksilisusest (nt ägeda toksilisuse katse ja/või vahemiku leidmise katsed) peaksid aitama sobivaid uuritavaid kontsentratsioone välja valida.

Kui uuritava lahuse valmistamiseks kasutatakse lahustit või dispergaatorit (vt punkti 1.6.4), ei tohiks selle lõplik kontsentratsioon katseanumas olla suurem kui 0,1 ml/l ning see kontsentratsioon peaks kõigis katseanumates olema sama.

1.8.3. **Kontrollkatsed**

Lisaks katseeriale tuleks teha üks katsekeskkonna kontrollkatsete seeria ja vajaduse korral ka üks lahustit või dispergaatorit sisaldav kontrollkatsete seeria. Lahusti või dispergaatori korral peaks nende kontsentratsioon olema sama mis uuritavat ainet sisaldavates anumates. Kasutada tuleks sobivat hulka dubleerivaid proove (vt punkti 1.8.1.3).

Tavaliselt peaks korralikult läbiviidud katse puhul olema kontrollrühmas (kontrollrühmades) vanema kohta saadud elus järglaste keskmise arvu variatsioonikordaja ≤ 25 % ning see tuleks ära märkida, kui katse kasutatakse eraldi peetavaid loomi.

1.8.4. **Katsekeskkonna uuendamine**

Katsekeskkonna uuendamise sagedus sõltub uuritava aine püsivusest, kuid see sagedus peaks olema vähemalt kolm korda nädalas. Kui esialgse püsivuse katse (vt punkti 1.4) käigus ilmneb, et maksimaalse uuendamisperioodi (st kolme päeva) jooksul ei ole uuritava aine kontsentratsioon püsiv (st väljaspool 80–120 % vahemikku või madalam kui 80 % esialgsest mõõdetud kontsentratsioonist), tuleks kaaluda katsekeskkonna sagedasemat uuendamist või kasutada läbi-voolukatset.

▼B

Kui katsekeskkonda uuendatakse poolstaatiliste katsete puhul, valmistatakse ette teine seeria katseanumaid ning vanemad teiseldatakse nendes sobiva läbimõõduga klaasipipeti abil. Koos kiivrikutega teiseldatava katsevedeliku kogus peaks olema minimaalne.

1.8.5. Vaatlused

Katse jooksul tehtud vaatluste tulemused tuleks panna kirja andmelehtedele (vt näidiseid 3. ja 4. liites). Kui on vaja teha muid määramisi (vt 1.3 ja 1.8.8), võib vajalikuks osutada täiendavate vaatluste tegemine.

1.8.6. Järglased

Iga vanema järglased tuleks eelistatavalt pärast esimese haudme ilmumist iga päev eemaldada ja üle lugeda, et nad ei saaks ära süüa täiskasvanud isendile mõeldud sööta. Käesoleva meetodi puhul tuleb üle lugeda ainult elusad järglased, kuid kirja tuleks panna ka aborteerunud munad ja surnud järglased.

1.8.7. Suremus

Vanemate suremus tuleks registreerida soovitatavalt kord päevas vähemalt järglaste loendamise ajal.

1.8.8. Muud parameetrid

Kuigi selle meetodi põhieesmärk on hinnata mõjusid sigivusele, on võimalik ka muude mõjude esinemine piisavates kogustes selleks, et neid statistiliselt analüüsida. Väga soovitatav on kasvuandmete kogumine, sest see annaks teavet võimalike subletaalsete mõjude kohta, mis võivad olla kasulikud kui ainult sigivust käsitlevate mõõtmiste tulemused; katse lõpus on soovitatav mõõta vanemate pikkus (st kehapiikkus, v.a koja tagaotsas olev oga). Lisaks sellele võib mõõta või arvutada veel järgmised parameetrid: aeg esimese haudme (ja sellele järgnevate haudmete) saamiseni, haudmete arv ja suurus looma kohta, aborteerunud haudmete arv, isasloomade ja rüpjade esinemine ja populatsiooni kasvu sisemine määr.

1.8.9. Analüütiliste määramiste ja mõõtmiste sagedus

Hapnikusisaldust, temperatuuri, vee karedust ja pH taset tuleks mõõta vähemalt kord nädalas värskes ja vanas katsekeskkonnas, kontrollrühmas (-rühmades) ja kõrgeima uuritava aine kontsentratsiooniga katseanumas.

Katse käigus määratakse uuritava aine kontsentratsioon kindlaks korrapäraste ajavahemike järel.

Poolstaatiliste katsete puhul, kui võib eeldada, et uuritava aine kontsentratsioon jääb vahemikku ± 20 % nimiväärtusest (st vahemikku 80–120 %; vt 1.4 ja 1.8.4), on soovitatav analüüsida vähemalt madalaimat ja kõrgeimat uuritavat kontsentratsiooni vahetult pärast valmistamist ja uuendamise ajal üks kord esimese nädala jooksul (st analüüsida tuleks proovi, mis on võetud samast lahusest – kohe pärast valmistamist ja uuendamise ajal). Hiljem tuleks nimetatud määramisi korrata vähemalt iga nädala järel.

▼B

Kui katsete puhul ei eeldata, et uuritava aine kontsentratsioon jääb vahemikku $\pm 20\%$ nimiväärtusest, tuleb analüüsida kõiki uuritavaid kontsentratsioone vahetult pärast valmistamist ja uuendamise ajal. Kui aga tegemist on katsega, mille puhul esialgne mõõdetud uuritava aine kontsentratsioon ei jää vahemikku $\pm 20\%$ nimiväärtusest, kuid esitatakse piisavalt tõendeid selle kohta, et esialgsed kontsentratsioonid on korratavad ja püsivad (st jäävad vahemikku 80–120 % esialgselt kontsentratsioonist), võib katse teisel ja kolmandal nädalal keemilisi määramisi vähendada ja piirduda vaid kõrgeima ja madalaima uuritava kontsentratsiooni analüüsimisega. Igal juhul tuleb enne uuendamist määrata uuritava aine kontsentratsioon ainult ühel dubleerivat proovi sisaldaval anumal iga uuritava kontsentratsiooni kohta.

Kui kasutatakse läbivoolukatset, on otstarbekas kasutada samasugust korda nagu poolstaatiliste katsete puhul kirjeldatud (kuid sellisel juhul ei ole võimalik mõõta „vanu“ lahuseid). Siiski võib olla soovitatav suurendada proovide võtmise arvu esimesel nädalal (nt kolm mõõtmist), et tagada uuritavate kontsentratsioonide püsivuse säilimine. Seda tüüpi katsete puhul tuleks lahjendusvedeliku ja uuritava aine voolukiirust kontrollida iga päev.

Kui on tõendeid selle kohta, et uuritava aine kontsentratsioon on kogu katse vältel püsinud rahuldaval moel vahemikus $\pm 20\%$ nimiväärtusest või esialgselt mõõdetud kontsentratsioonist, võivad tulemused põhineda nimiväärtusel või esialgselt mõõdetud väärtusel. Kui kõrvalekaldumine nimiväärtusest või esialgselt mõõdetud kontsentratsioonist on suurem kui $\pm 20\%$, tuleks tulemused esitada aja-kaalu keskmistena (vt 5. liidet).

2. ANDMED JA ARUANDLUS

2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE

Käesoleva katse eesmärk on määrata kindlaks uuritava aine mõju katse lõpus elus olevate vanemate kohta saadud elus järglaste koguarvule. Vanema kohta saadud järglaste koguarv tuleks arvutada iga katseanuma (st iga dubleeriva proovi) kohta. Kui mõnes dubleerivas proovis kasutatav vanem sureb katse ajal või osutub isasloomaks, jäetakse see dubleeriv proov analüüsist välja. Analüüsi aluseks võetakse sel juhul väiksem arv dubleerivaid proove.

Kui hinnatakse kemikaali mõju sigivusele ja määratakse LOEC ja seega ka NOEC, tuleb arvutada keskmine sigivus dubleerivate proovide lõikes iga kontsentratsiooni puhul ja summaarse standardhälbe jääk ning seda saab teha dispersioonanalüüsiga (ANOVA). Seejärel tuleb iga kontsentratsiooni keskmist võrrelda kontrollrühma keskmisega, kasutades selleks sobivat mitmese võrdluse meetodit. Dunnetti ja Williamsi katsed võivad olla kasulikud (14, 15, 16, 17). Tuleb kontrollida, kas ANOVA eeldus dispersiooni homogeensuse kohta peab paika. Seda oleks soovitatav teha graafiliselt, mitte formaalse statistilise olulisuse katsega (18); alternatiivse võimalusena võib teha Bartletti katse. Kui see eeldus ei pea paika, tuleks kaaluda andmete teisendamist, et homogeniseerida dispersioon enne ANOVA tegemist, või kaalutud ANOVA tegemist. ANOVA abil täheldatud mõju suurus (st väikseim tähendust omav erinevus) tuleks välja arvutada ja aruandes kirja panna.

▼B

Sellise kontsentratsiooni hindamiseks, mis põhjustaks paljunemisvõime 50 % vähenemise (st EC_{50}), tuleks andmetega sobitada sobiv kõver, näiteks logistiline kõver, kasutades näiteks sellist statistikameetodit nagu vähimruutude meetod. Kõvera võiks parametrizeerida nii, et EC_{50} ja selle standardviga saaks vahetult hinnata. See hõlbustaks märkimisväärselt EC_{50} usalduspiiri arvutamist. Kui puuduvad põhjused eelistada teistsuguseid usaldusnivoosid, tuleks kasutada kahepoolset 95 % usalduspiiri. Sobituskord võiks olla selline, et selle põhjal saaks hinnata sobivuse puudumise tähendust. Seda saab teha graafiliselt või jagades ruutude jääksumma sobivuse puudumise ja puhta vea komponentideks ning tehes sobivuse puudumise statistilise olulisuse katse. Selliste menetluste puhul, millega kaasneb sigivuse kõrge tase, on saadud noorloomade arvu dispersioon tõenäoliselt suurem kui menetluse puhul, millega kaasneb sigivuse madal tase, ja seetõttu tuleks kaaluda täheldatud väärtuste kaalumist selliselt, et neis kajastuks erinev dispersioon eri menetlusrühmades (taustainfo kohta vt viidet 18).

Lõpliku laboritevahelise võrdlusuuringu (2) andmete analüüsimiseks sobitati logistiline kõver järgmise valemi abil, kuid kasutada võib ka muid sobivaid valemeid:

$$Y = \frac{c}{1 + \left(\frac{x}{x_0}\right)^b}$$

kus:

Y = katse lõpus elus oleva vanema kohta saadud noorloomade koguarv (arvutatud iga anuma kohta)

x = aine kontsentratsioon

c = noorloomade eeldatav arv, kui x = 0

x_0 = populatsiooni EC_{50}

b = tõusu iseloomustav parameeter.

Nimetatud valem sobib tõenäoliselt suure hulga olukordade jaoks, kuid on olemas ka katseid, mille jaoks see ei sobi. Valemi valiidust tuleks kontrollida eespool soovitatud viisil. Mõningatel juhtudel võib otstarbekaks osutada hormeesivalem, mille puhul madalal kontsentratsioonil on märkimisväärne mõju (19).

Hinnata võib ka muid mõjuga seotud kontsentratsioone, näiteks EC_{10} ja EC_{20} , kuigi valemi puhul võiks eelistada teistsugust parametriseerimist kui seda, mille abil hinnati EC_{50} .

2.2. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

2.2.1. Uuritav aine:

— füüsikaline loomus ja asjaomased füüsikalised-keemilised;

▼B

- omadused, keemilised identifitseerimisandmed, sealhulgas puhtus.

2.2.2. Katsealused liigid:

- kloon (kas genotüüp on määratud), tarnija või päritolu (kui on teada) ja kasutatud kultiveerimistingimused. Kui kasutatakse muud hiidkiivriku liiki, tuleks see ära märkida ja seda põhjendada.

2.2.3. Katsetingimused:

- kasutatud katsemeetod (nt poolstaatiline või läbivoolukatse, ruumala, kiivrikute arv liitri kohta);
- fotoperiood ja valguse intensiivsus;
- katse kavandamine (nt dubleerivate proovide arv, vanemate arv dubleeriva proovi kohta);
- andmed kasutatud kultiveerimiskeskonna kohta;
- vajaduse korral kasutatud orgaanilised lisained, sh koostis, päritolu, valmistusmeetod, põhilahuse summaarne orgaanilise süsiniku sisaldus/keemiline hapnikutarve, sellest tulenev summaarne orgaanilise süsiniku sisalduse/keemilise hapnikutarbe hindamine katsekeskkonnas;
- üksikasjalikud andmed söötmise kohta, sealhulgas kogus (mg C kiivriku kohta päevas) ja ajakava (nt sööda (söötade) liik, sh vetikate puhul konkreetne (liigi) nimi ja võimaluse korral ka liin, kultiveerimistingimused);
- põhilahuse valmistamise meetod ja uuendamissagedus (kui kasutatakse lahustit või dispergaatorit, tuleb esitada selle nimi ja kontsentratsioon).

2.2.4. Tulemused:

- võimalike uuritava aine püsivust käsitlevate eeluuringute tulemused;
- nominaalsed uuritavad kontsentratsioonid ja kõigi uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks katseanumates tehtud analüüside tulemused (vt andmelehtede näidised 4. liites); esitada tuleks ka meetodi tulemuslikkus ja määramispiir;
- katseanumates oleva vee kvaliteet (st pH, temperatuur ja lahustunud hapniku sisaldus, summaarne orgaanilise süsiniku sisaldus ja/või keemiline hapnikutarve ja vajaduse korral vee karedus) (vt andmelehe näidist 3. liites);
- täielikud andmed iga vanema saadud elus järglaste kohta (vt andmelehe näidist 3. liites);
- vanemate surmajuhtude arv ja surmapäev (vt andmelehe näidist 3. liites);
- kontrollrühma sigivuse variatsioonikordaja (katse lõpus elus oleva vanema kohta saadud elus järglaste koguarvu põhjal);
- graafik, mis kirjeldab katse lõpus elus oleva vanema (iga dubleeriva proovi puhul) kohta saadud järglaste koguarvu suhet uuritava aine kontsentratsiooniga;
- vähim sigivusele toimet avaldav kontsentratsioon (LOEC), sh kasutatud statistiliste menetluste kirjeldus ja märges selle kohta, kui suurt mõju täheldati, ning sigivusele täheldatavat toimet mitteavaldav kontsentratsioon (NOEC); vajaduse korral tuleks esitada LOEC/NOEC ka vanemate suremuse kohta;

▼B

- vajaduse korral sigivuse EC_x ja usaldusvahemikud ja selle arvutamiseks kasutatud sobitatud valemi graafik, annuse-reaktsiooni kõvera tõusja selle standardviga;
- muud täheldatud bioloogilised mõjud või mõõtmised; esitada tuleb andmed kõigi täheldatud või mõõdetud bioloogiliste mõjude kohta (nt vanemate kasv) koos võimalike asjakohaste põhjendustega;
- selgitused kõigi katsemeetodist kõrvalekaldumiste kohta.

3. **VIITED**

- 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, pp. 257-265.
- 4) Elendt B. P., (1990). Selenium deficiency in Crustacea; An ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, pp. 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, pp. 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.), pp. 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, pp. 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), pp. 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, pp. 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, pp. 459-466.
- 14) Dunnett C. W., (1955). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. *J. Amer. Statist. Assoc.*, 50, pp. 1096-1121.
- 15) Dunnett C. W., (1964). New tables for multiple comparisons with a control. *Biometrics*, 20, pp. 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, pp. 103-117.
- 17) Williams D. A. (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. *Biometrics*, 28, pp. 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, pp. 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, pp. 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, pp. 1156-1166.



1. liide

TÄIELIKULT MÄÄRATLETUD ELENDTI KESKKONDADE M7 JA M4

Valmistamine

Kohanemine Elenkti keskkondadega M7 ja M4

Mõningates laboratooriumites on olnud raskusi kiivrikute viimisega otse keskkonda m4 (1) ja m7. Mõningast edu on siiski saavutatud järkjärgulise aklimatiseerimisega, st viimine oma keskkonnast 30 % elendti sisaldusega keskkonda, seejärel 60 % ja siis 100 % elendti sisaldusega keskkonda. Kohanemisaeg võib kesta kuni kuu aega.

Valmistamine

Mikroelemendid

Kõigepealt valmistatakse sobiva puhtusastmega vees, nt deioniseeritud, destilleeritud või pöördosmoosi teel puhastatud vees individuaalsete mikroelementide eraldi põhilahused (I). Nendest erinevatest põhilahustest (I) valmistatakse üks põhilahus (II), mis sisaldab kõiki mikroelemente (kombineeritud lahus), st:

Põhilahused I (üks aine)	Vette lisatav hulk (mg/l)	Kontsentratsioon (keskkonnas M4) (kordades)	Kombineeritud põhilahuse II valmistamiseks lisada veele järgmine kogus põhilahust I (ml/l)	
			M4	M7
H ₃ BO ₃	57 190	20 000	1,0	0,25
MnCl ₂ * 4H ₂ O	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 * 6H ₂ O	3 040	20 000	1,0	0,25
NaBr	320	20 000	1,0	0,25
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	1 260	20 000	1,0	0,25
CuCl ₂ * 2H ₂ O	335	20 000	1,0	0,25
ZnCl ₂	260	20 000	1,0	1,0
CoCl ₂ * 6H ₂ O	200	20 000	1,0	1,0
KI	65	20 000	1,0	1,0
Na ₂ SeO ₃	43,8	20 000	1,0	1,0
NH ₄ VO ₃	11,5	20 000	1,0	1,0
Na ₂ EDTA * 2H ₂ O	5 000	2 000	—	—
FeSO ₄ * 7H ₂ O	1 991	2 000	—	—
21 Fe-EDTA lahus		1 000	20,0	5,0

Nii Na₂EDTA kui ka FeSO₄ lahused valmistatakse eraldi, valatakse kokku ja autoklaavitakse kohe. Tulemuseks saadakse:

▼B

Keskkonnad M4 ja M7

Keskkondade M4 ja M7 valmistamiseks kasutatakse põhilahust II, makroelemente ja vitamiine järgmiselt:

	Vette lisatav hulk (mg/l)	Kontsentratsioon (keskkonnas M4) (kordades)	Keskkonna valmistamiseks lisatud põhilahuse hulk (ml/l)	
			M4	M7
Põhilahus II, kombineeritud mikroelemendid		20	50	50

Makroelementide põhilahused (üks aine)

CaCl ₂ * 2H ₂ O	293 800	1 000	1,0	1,0
MgSO ₄ * 7H ₂ O	246 600	2 000	0,5	0,5
KCl	58 000	10 000	0,1	0,1
NaHCO ₃	64 800	1 000	1,0	1,0
Na ₂ SiO ₃ * 9H ₂ O	50 000	5 000	0,2	0,2
NaNO ₃	2 740	10 000	0,1	0,1
KH ₂ PO ₄	1 430	10 000	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	1 840	10 000	0,1	0,1
Kombineeritud vitamiinide lahus	—	10 000	0,1	0,1

Kombineeritud vitamiinide lahuse valmistamiseks lisatakse 3 vitamiini 1 liitrile veele järgmiselt:

Tiamiinhüdrokloriid	750	10 000	—	—
Tsüanokobalamiin (B ₁₂)	10	10 000	—	—
Biotiin	7,5	10 000	—	—

Kombineeritud vitamiinide lahust säilitatakse külmutatuna väikestes alikvootides. Vitamiinid lisatakse katsekeskkonnale vahetult enne kasutamist.

Märkused Soolade sadestumise vältimiseks valmiskeskkonna valmistamisel lisatakse põhilahuse alikvoodid umbes 500–800 ml deioniseeritud veele ning seejärel lisatakse juurde nii palju vett, et kokku saaks 1 liiter.

M4 keskkonda käsitleva uuringu esimene väljaanne: Elendt, B.P. (1990). Selenium deficiency in crustacea; an ultrastructural approach to antennal damage in *Daphnia magna* Straus. *Protoplasma*, 154, pp. 25-33.



2. liide

SUMMAARSE ORGAANILISE SÜSINIKU SISALDUSE ANALÜÜS JA VETIKATEL PÕHINEVA SÖÖDA JAOKS SUMMAARSE ORGAANILISE SÜSINIKU SISALDUSE NOMOGRAMMI KOOSTAMINE

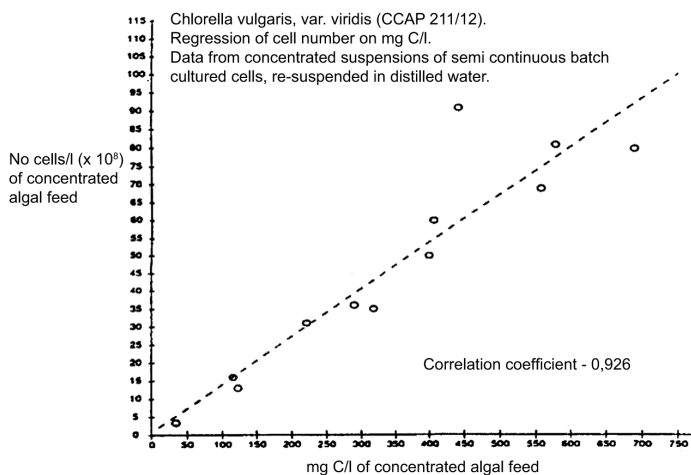
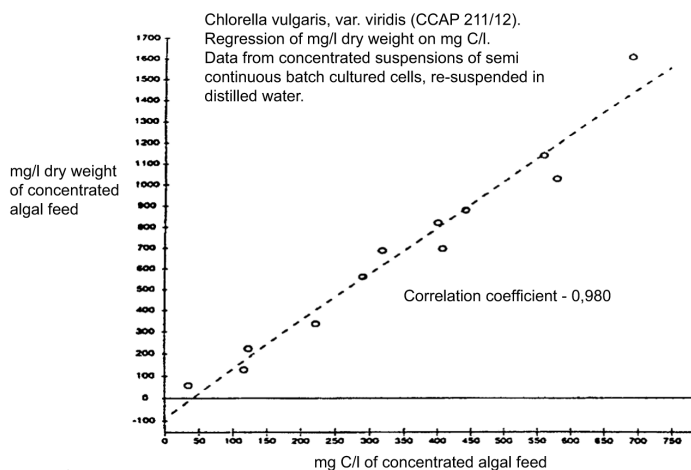
On teada, et vetikatel põhineva sööda süsinikusisaldust ei mõõdeta tavaliselt otse, vaid asendusparameetrite mõõtmistest (nt vetikarakkude arv või valguse neelduvus) tulenevate korrelatsioonide (st nomogrammi) põhjal.

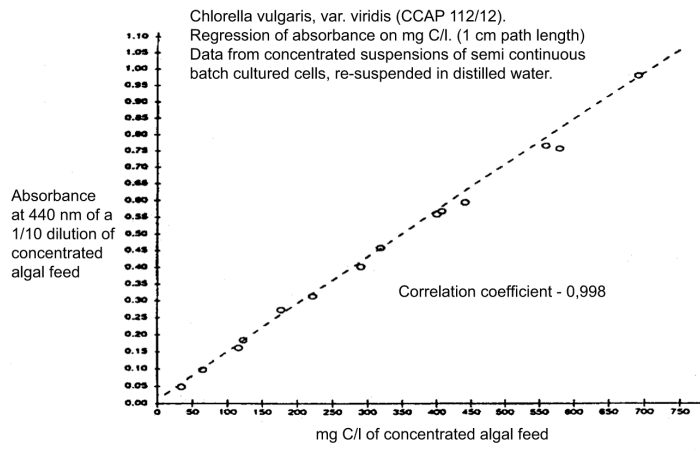
Summaarset orgaanilise süsiniku sisaldust tuleks mõõta pigem kõrgel temperatuuril toimuva oksüdatsiooni kui UV või persulfaatmeetodiga. (Vt: The Instrumental Determination of Total Organic Carbon, Total Oxygen Demand and Related Determinands 1979, HMSO 1980; 49 High Holborn, London WC1V 6HB).

Nomogrammi koostamiseks tuleks vetikad eraldada kasvukeskkonnast tsentrifugimisega, mille järgneb resuspendeerimine destilleeritud vees. Asendusparameeter ja summaarne orgaanilise süsiniku sisaldus tuleb mõõta igas proovis kolm korda. Analüüsida tuleks ainult destilleeritud ve sisaldavaid proove ning summaarne orgaanilise süsiniku sisaldus leitakse saadud sisalduse lahutamisel vetikaproovi summaarse orgaanilise süsiniku sisaldusest.

Nomogramm peaks nõutava süsinikusisalduse vahemikus olema lineaarne. Näited on esitatud allpool.

Märkus. Neid ei tohiks kasutada teisendamiseks; on oluline, et laboratooriumid koostaksid oma nomogrammid ise.



▼ B

3. liide

SELLISE ANDMELEHE NÄIDIS, MILLELE MÄRGITAKSE KESKKONNA UUENDAMINE, FÜÜSIKALISE/KEEMILISE JÄLGIMISE ANDMED, SÖÖTMINE, KIIVRIKUTE SIGIVUS JA TÄISKASVANUD ISENDITE SUREMUS

Katse nr:	Algkuupäev:			Kloon:			Keskkond:			Sööda liik:			Uuritav aine:			Nimikonsentratsioon:								
Päev	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21		
Keskkonna uuendamine (märkida ristiga)																								
PH (*)																								uus
																								vana
O ₂ mg/l (*)																								uus
																								vana
Temperatuur (° C) (*)																								uus
																								vana
Söötmine (märkida ristiga)																								
Elus järglaste arv† (†)																								Kokku
Anum 1																								
2																								
3																								
4																								
5																								

▼B

Katse nr:	Alguupäev:			Kloon:			Keskkond:			Sööda liik:			Uuritav aine:			Nimikontsentratsioon:								
Päev	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																								
																								Kokku
Kumulatiivne täiskasvanud isendite suremus (*)																								

(*) Märkida, millist anumad katseks kasutati.

† Aborteerunud haudmed märkida vajalikku lahtrisse lühendiga „AB”.

‡ Täiskasvanud isendite suremus märkida vajalikku lahtrisse lühendiga „M”.

▼B

4. liide

SELLISE ANDMELEHE NÄIDIS, MILLELE MÄRGITAKSE KEEMILISE ANALÜÜSI TULEMUSEDa) **Mõõdetud kontsentratsioonid**

Nimikontsentratsioon	1. nädala proov		2. nädala proov		3. nädala proov	
	Värske	Vana	Värske	Vana	Värske	Vana

b) **Mõõdetud kontsentratsioon nimiväärtuse protsendimäärana**

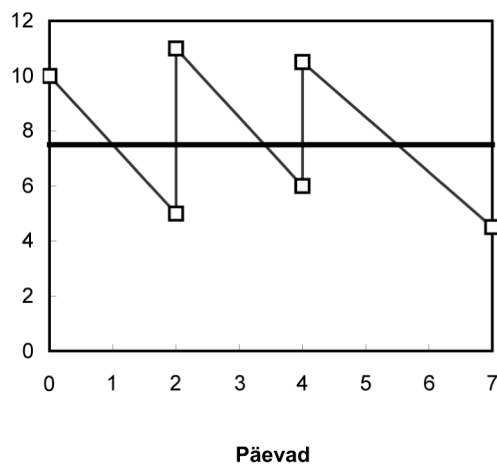
Nimikontsentratsioon	1. nädala proov		2. nädala proov		3. nädala proov	
	Värske	Vana	Värske	Vana	Värske	Vana

▼ B

5. liide

AJA-KAALU KESKMISE ARVUTAMINE**Aja-kaalu keskmine**

Arvestades, et uuritava aine kontsentratsioon võib keskkonna uuendamiste vahel väheneda, tuleb vaagida, milline kontsentratsioon on kiivrikute emasloomade keskkonnas esinenud kontsentratsioonide suhtes esindav. Valiku tegemisel tuleks lähtuda nii bioloogilistest kui ka statistilistest teguritest. Näiteks kui arvatakse, et sigivust mõjutab kõige enam kõrgeim kontsentratsioon, siis tuleks kasutada maksimaalset kontsentratsiooni. Kui aga arvatakse, et olulisem on toksilise aine akumulatiivne või pikaajaline mõju, siis on otstarbekam kasutada keskmist kontsentratsiooni. Sellisel juhul on sobiv keskmisena kasutada aja-kaalu keskmist kontsentratsiooni, kuna selle puhul võetakse arvesse hetkekontsentratsioonide varieerumist aja jooksul.

Joonis 1.**Aja-kaalu keskmise näide**

Joonisel 1 on näide (lihtsustatud) katse kohta, mis kestis seitse päeva ja mille puhul vahetati keskkonda 0-, 2. ja 4. päeval.

Peenike sakiline joon väljendab kontsentratsiooni igal ajahetkel. Eeldatakse, et kontsentratsiooni langus vastab eksponentsiaalse lagunemisprotsessile.

Kuus joonisele märgitud punkti kujutavad iga uuendamisperioodi alguses ja lõpus mõõdetud täheldatud kontsentratsioone.

Jäme pidevjoon näitab aja-kaalu keskmise asukohta.

Aja-kaalu keskmine arvutatakse selliselt, et aja-kaalu keskmise joone alla jääv ala on võrdne kontsentratsioonikõvera alla jääva alaga. Eespool toodud näidet käsitlevad arvutused on esitatud tabelis 1.



Tabel 1

Aja-kaalu keskmise arvutamine

Uuendami ne nr	Päevad	Conc0	Conc1	Ln(Conc0)	Ln(Conc1)	Pindala
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
Päevad kokku: 7					Üldpindala	50,091
					Aja-kaalu keskmine	7,156

Päevad tähistab uuendamisperioodi päevade arvu.

Conc0 tähistab iga uuendamisperioodi alguses mõõdetud kontsentratsiooni.

Conc1 tähistab iga uuendamisperioodi lõpus mõõdetud kontsentratsiooni.

Ln(Conc0) tähistab *Conc0* naturaallogaritmi.

Pindala tähistab iga uuendamisperioodi eksponentsiaalkõvera alla jäävat ala. See arvutatakse järgmise valemi kohaselt:

Ln(Conc1) tähistab *Conc1* naturaallogaritmi.

$$Pindala = \frac{Conc0 - Conc1}{Ln(Conc0) - Ln(Conc1)} \times Päevad$$

Aja-kaalu keskmine on üldpindala, mis on jagatud päevade summaga.

Kiivriku sigivuse katse puhul tuleb tabelit loomulikult pikendada selliselt, et see hõlmaks 21 päeva.

On selge, et kui vaatlusi tehakse ainult iga uuendamisperioodi alguses ja lõpus, ei ole võimalik kinnitada, et lagunemisprotsess on tegelikult eksponentsiaalne. Teistsuguse kõvera puhul oleks pindala arvutamine teistsugune. Eksponentsiaalse lagunemisprotsessi olemasolu ei ole siiski ebatõenäoline ning seega on seda kirjeldava kõvera kasutamine muu teabe puudumise korral kõige otstarbekam.

Juhul, kui keemilise analüüsiga ei leita uuendamisperioodi lõpus jälgi uuritavast aineist, tuleb siiski olla ettevaatlik. Kui aine kadumise kiirust lahusest ei ole võimalik hinnata, on võimatu saada kõvera alla tõele vastavat pindala ja seega ei ole võimalik saada mõistlikku aja-kaalu keskmist.

▼B**C.21. MULLAMIKROOBID: LÄMMASTIKU TRANSFORMATSIOONI KATSE****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 216 (2000).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod kirjeldab laborimeetodit, mis on välja töötatud kemikaalide pikaajaliste mõjude uurimiseks mullamikroobide lämmastiku transformatsiooni suhtes pärast ühekordset kokkupuudet. Katse põhineb peamiselt Euroopa ja Vahemeremaade taimekaitseorganisatsiooni soovitusel (1). Samuti võetakse arvesse muid juhised, sh Saksa Biologische Bundesanstalt (2), USA Keskkonnakaitseagentuuri (3), SETACi (4) ja Rahvusvahelise Standardiorganisatsiooni (5) juhiseid. Käesolevas katses kasutatavate mullaproovide arvu ja tüüpide osas lepiti kokku mulla ja sedimentide valikut käsitlevas OECD tööühmas, mis tuli kokku Belgirates Itaalias 1995. aastal (6). Mulla-proovide kogumist, käsitlemist ja säilitamist käsitlevad soovitused põhinevad ISO juhisdokumendil (7) ja Belgirate tööühma soovitusel. Katseainete toksiliste omaduste hindamisel võib osutada vajalikuks määrata kindlaks mõjud mulla mikroobsele aktiivsusele, nt kui vajatakse andmeid põllukultuuride kaitsevahendite võimalike kõrvalmõjude kohta mulla mikrofloora suhtes või kui eeldatakse mullamikroobide kokkupuudet muude kemikaalidega kui põllukultuuride kaitsevahendid. Lämmastiku transformatsiooni katse tehakse selleks, et kindlaks määrata selliste kemikaalide mõju mulla mikrofloorale. Kui uuritakse agrokemikaale (nt põllukultuuride kaitsevahendid, väetised, metsanduskemikaalid), sooritatakse nii lämmastiku transformatsiooni kui ka süsiniku transformatsiooni katse. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, piisab lämmastiku transformatsiooni katses. Kui selliste kemikaalide lämmastiku transformatsiooni katses saadud EC₅₀-väärtused on kaubanduslike nitrifikatsiooniinhibiitorite (nt nitrapüriin) esindavas vahemikus, saab täiendava teabe kogumiseks teha süsiniku transformatsiooni katse.

Muld koosneb elusatest ja elututes koostisosadest, mis eksisteerivad keerukates ja heterogeenseses segudes. Mikroobid mängivad tähtsat rolli viljaka mulla orgaanilise aine hajutamisel ja muutmisel, ning mõned liigid mõjutavad mulla viljakuse erinevaid aspekte. Kõik nimetatud biokeemiliste protsesside pikaajalised häired võivad häirida toitaineringlust ja see võib muuta mulla viljakust. Süsiniku ja lämmastiku transformatsioon toimub kõikides viljakates muldades. Kuigi nimetatud protsesse põhjustavad mikroobikogumid on mullati erinev, on transformatsioonirajad oma olemuselt samad.

Käesolev katsemeetod on välja töötatud selleks, et avastada aine pikaajalisi negatiivseid mõjusid aeroobsete pinnamuldade lämmastikutransformatsiooni protsessile. Katsemeetod võimaldab samuti hinnata ainete mõjusid mulla mikrofloora süsiniku transformatsioonile. Nitraat tekib pärast süsinik-lämmastiksidemete lagunemist. Seetõttu kui nitraadi teke leitakse olevat samal tasemel katse- ja kontrollmuldades, on väga tõenäoline, et peamised süsinikusidemete lagunemisteed on puutumata ja toimivad hästi. Katses kasutatava substraadi (peenestatud lutsernijahu) süsiniku-lämmastiku suhe on soodne (tavaliselt 12/1 ja 16/1). Seetõttu ei vähendata süsiniku puudust katse käigus ja kui mikroobikogumeid kahjustab kemikaal, siis taastuvad need 100 päeva jooksul.

▼B

Käesoleva katsemeetodi aluseks olevad katsed töötati välja peamiselt ainete jaoks, mille pinnasesse jõudvat kogust saab ennustada. Sellised ained on näiteks põllukultuuride kaitsevahendid, mille annustamine põllule on teada. Agrokemikaalide puhul piisab sellest, kui uuritakse kahte annust oletatava annustamissageduse osas. Agrokemikaalide puhul saab uurida toimeaineid (a.i.) või preparaate. Katse ei piirdu siiski vaid agrokemikaalidega. Muutes nii pinnasesse annustavaid katseaine koguseid kui ka seda, kuidas andmeid hinnatakse, saab kasutada katset kemikaalide puhul, mille pinnasesse jõudev kogus ei ole teada. Seega määratakse kindlaks muude kemikaalide kui agrokemikaalid puhul kontsentratsiooni ridade mõjud lämmastiku transformatsioonile. Nimetatud katsetest saadud andmeid kasutatakse annuse-reaktsiooni kõvera koostamiseks ja EC_x väärtuste arvutamiseks, milles x on mõju protsendina.

1.2. MÕISTED

Lämmastiku transformatsioon – mikroobide tegevuse tulemusena ammonifikatsiooni- ja nitrifikatsiooniprotsessi kaudu toimuv, lämmastikku sisaldava orgaanilise aine lõplik lagunemine vastavaks anorgaaniliseks lõppsaaduseks, nitraadiks.

EC_x (efektiivkontsentratsioon) – mullas esineva katseaine kontsentratsioon, mis tõkestab lämmastiku transformatsiooni nitraadiks x protsenti.

EC_{50} (efektiivkontsentratsiooni mediaan) – mullas esineva katseaine kontsentratsioon, mis tõkestab lämmastiku transformatsiooni nitraadiks 50 protsenti (50 %).

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Sõelutud mulda parandatakse peenestatud taimejahuga ning seda kas töödeldakse seejärel katseainega või jäetakse töötlemata (kontrollproov). Kui uuritakse agrokemikaale, on soovitatav kasutada vähemalt kahte katsekonsentratsiooni ja need tuleks valida suurima kontsentratsiooni suhtes, mis eeldatavasti esineb põllul. Pärast inkubeerimise 0-, 7., 14. ja 28. päeva ekstraheeritakse katse- ja kontrollmullaproove sobiva lahustiga ning määratakse kindlaks ekstraktides esinevad nitraadikogused. Nitraaditekke kiirust katseproovides võrreldakse kiirusega kontrollproovides ning arvutatakse katse- ja kontrollproovide protsentuaalne hälve. Kõik katsed kestavad vähemalt 28 päeva. Kui 28. päeval on katse- ja kontrollmullaproovide vahelised erinevused võrdsed või suuremad kui 25 %, jätkatakse mõõtmisi kuni 100 päeva. Kui ei uurita agrokemikaale, lisatakse mullaproovidele katseaine kontsentratsiooni ridu ning katse- ja kontrollproovides tekkinud nitraadikoguseid mõõdetakse pärast 28 inkubeerimispäeva. Mitmekordseid kontsentratsioone käsitlevate katsete tulemusi analüüsitakse regressioonimudelit kasutades, ning arvutatakse väärtused (s.t EC_{50} , EC_{25} ja/või EC_{10}). Vt mõisteid.

1.5. KATSE VALIIDSUS

Agrokemikaalidega tehtud katsete tulemuste hindamine põhineb suhtelistelt väikestel erinevustel (s.t keskmine väärtus on ± 25 %) kontroll- ja katsemullaproovide nitraadi kontsentratsioonide vahel, et kontrollproovide suured muutused võib viia väärte tulemusteni. Seetõttu peaksid paralleelsete kontrollproovide vahelised muutused olema väiksemad kui ± 15 %.

▼B

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. **Seadmed**

Katsetes kasutatakse mahuteid, mis on valmistatud keemiliselt inertsest materjalist. Mahutite mahutavus peaks vastama mullaproovide inkubeerimisprotseduurile, s.t üksikute mullaproovide massina või sarjana inkubeerimine (vt punkti 1.7.1.2). Tuleks tagada, et veekadu oleks katse käigus minimaalne ja gaasivahetus oleks võimalik (nt võib katsemahutid katta perforeeritud polüetüleenkilega). Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks kasutada mastabeeritavaid ja gaasi-kindlaid mahuteid. Need peaksid olema sellise suurusega, et ligikaudu üks neljandik nende mahust täidetakse mullaprooviga.

Katses kasutatakse järgmiseid standardseid laboriseadmeid:

— segamisseade: mehaaniline segur või vastav seade;

— tsentrifuug (3 000 g) või filtreerimisseade (kasutades nitraadivaba filterpaberit);

— nitraadi analüüsi jaoks piisava tundlikkuse mõõteseade, mille mõõtmistulemus on korduvteostatav.

1.6.2. **Mullaliikide valik ja arv**

Kasutatakse ühte mullaliiki. Soovitavad mullaomadused on järgmised:

— liivasisaldus: vähemalt 50 % ja kuni 75 %;

— pH: 5,5–7,5;

— orgaanilise süsiniku sisaldus: 0,5–1,5 %;

— mikroobi biomassi tuleks mõõta (8, 9) ja selle süsinikusisaldus peaks olema vähemalt 1 % mulla orgaanilise süsiniku koguhulgast.

Enamikul juhtudel nimetatud omadustega muld esindab halvimat juhtu, kuna uuritava kemikaali absorptsioon on minimaalne ja selle kättesaadavus mikrofloorale on suurim. Sellest tulenevalt ei ole katsed muude mullaliikidega üldiselt vajalikud. Teatud juhtudel, nt kui katseainet eeldatavasti kasutatakse peamiselt muldades, nt happelised metsamullad, või kui kemikaalid on elektrostaatiliselt laetud, võib osutada vajalikuks kasutada ka muud mullaliiki.

▼B**1.6.3. Mullaproovide kogumine ja säilitamine****1.6.3.1. Kogumine**

Üksikasjalik teave proovikogumiskoha ajaloo kohta peaks olema kättesaadav. Üksikasjade hulka kuuluvad täpne asukoht, taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemise kuupäevad, orgaaniliste ja anorgaaniliste väetistega töötlemine, bioloogiliste materjalide lisamine või juhuslik saastumine. Mullaproovide kogumiseks valitud kohta peaks saama kasutada pikka aega. Sobivad on püsikarjamaad, üheaastaste teraviljakultuuridega (v.a mais) põllud või tihedalt külvatud haljaskesa. Valitud proovivõtukohta ei tohiks töödelda põllukultuuride kaitsevahenditega vähemalt ühe aasta jooksul enne proovide võtmist. Samuti ei tohiks kasutada orgaanilisi väetisi vähemalt kuus kuud. Mineraalväetiste kasutamine on lubatud üksnes siis, kui see vastab põllukultuuride nõuetele ja mullaproove ei tohiks võtta vähemalt kolm kuud pärast väetise kasutamist. Biotsiidi mõjuga (nt kaltsiumtsüaanamiid) väetistega töödeldud mulla kasutamist tuleks vältida.

Proovide võtmist tuleks vältida pikkade (rohkem kui 30 päeva) põua- või vettimisperiodide ajal või vahetult pärast seda. Küntud muldade puhul tuleks proovid võtta 0–20 cm sügavuselt. Rohumaade (karjamaade) või muude muldade puhul, kui ei ole pikka aega küntud (vähemalt ühe kasvuperioodi vältel), peaks proovivõtu suurim sügavus olema veidi rohkem kui 20 cm (nt kuni 25 cm).

Mullaproovid tuleks transportida mahutites ja temperatuuridel, mis tagavad, et algseid mullaomadusi ei muudeta oluliselt.

1.6.3.2. Säilitamine

Värskest põllult kogutud mulla kasutamine on eelistatud. Kui ei säilitamine laboris on vältimatu, võib mullaproovid lahustada pimedas temperatuuril 4 ± 2 °C maksimaalselt kolmeks kuuks. Mullaproovide säilitamise ajal tuleb tagada aeroobsed tingimused. Kui mullaproovid kogutakse piirkondadest, kus maapind on vähemalt kolm kuud aastas külmunud, saab kaaluda nende säilitamist kuueks kuuks miinus 18 °C kuni miinus 22 °C juures. Säilitatud mullaproovide mikroobi biomassi mõõdetakse enne igat katset ja biomassis peaks olema süsinikku vähemalt 1 % mulla orgaanilise süsiniku kogusaldusest (vt punkti 1.6.2).

1.6.4. Mullaproovide käsitlemine ja katseks ettevalmistamine**1.6.4.1. Eelinkubeerimine**

Kui mullaproovid säilitati (vt punkti 1.6.3.2), on soovitatav eelinkubeerida 2–28 päeva. Mulla temperatuur ja niiskusesisaldus eelinkubeerimise ajal peaksid olema samasugused kui need, mida kasutati katstes (vt punkte 1.6.4.2 ja 1.7.1.3).

▼B1.6.4.2. *Füüsikalis-keemilised omadused*

Muld puhastatakse käsitsi suurtest objektidest (nt kivid, taimeosad jne) ning seejärel märgsõelutakse ilma liigselt kuivatamata 2 mm või sellest väiksemateks osakeste suuruseks. Mullaproovi niiskusesisaldust peaks reguleerima destilleeritud või deioniseeritud veega 40–60 % maksimaalse veemahutavuseni.

1.6.4.3. *Parandamine orgaanilise substraadiga*

Mulda tuleks parandada sobiva orgaanilise substraadiga, nt peenes-tatud lutserni-rohujahu seguga (põhiline koostisosa on *Medicago sativa*), mille süsiniku-lämmastiku suhe on 12/1 ja 16/1. Soovitav lutserni-mulla suhe on 5 g lutserni ühe kilogrammi mulla kohta (kuivmass).

1.6.5. **Katseaine ettevalmistamine mulda annustamiseks**

Katseainet annustatakse tavaliselt kandeaine abil. Kandeaine võib olla vesi (veeslahustuvate ainete puhul) või inertne tahke aine, nt peen kvartslüv (mille osakeste suurus on 0,1–0,5 mm). Vedelaid, veest erinevaid kandeaineid (nt orgaanilisi lahusteid, nagu atsetoon, kloroform) tuleks vältida, kuna nad võivad kahjustada mikrofloorat. Kui kasutatakse kandeainena liiva, saab selle katta katseainega, mis on sobivas lahustis lahustatud või suspendeeritud. Sellisel juhul tuleks lahusti eemaldada aurustumise teel enne mullaga segamist. Katseaine optimaalseks jaotumiseks mullas on soovitav suhe 10 g liiva ühe kilogrammi mulla kohta (kuivmass). Kontrollproove töödeldakse sarnase veehulgaga ja/või üksnes kvartslüvaga.

Kui uuritakse lenduvaid kemikaale, tuleks vältida kadusid töötlemise ajal niipalju kui võimalik ja tuleks püüda tagada homogeenne jaotus mullas (nt katseainet tuleks injekeerida mulda mitmes kohas).

1.6.6. **Uuritavad kontsentratsioonid**

Kui uuritakse agrokemikaale, tuleks kasutada vähemalt kahte kontsentratsiooni. Väiksem kontsentratsioon peaks kajastama vähemalt katseaine kasutamisel mulda jõudvat suurimat eeldatavat kogust ning suurem kontsentratsioon peaks olema väiksema kontsentratsiooni kordne. Mulda lisatavate katseainete kontsentratsioonid arvutatakse eeldusel, et aine imendub ühtlaselt 5 cm sügavusele ja mulla lasuvustihedus on 1,5. Agrokemikaalide puhul, mida annustatakse otse mulda, või kemikaalide puhul, mille mulda jõudvat kogust saab ennustada, on soovitavad katsekonsentratsioonid suurimad arvutuskonsentratsioonid (PEC) ja neist viis korda suuremad kontsentratsioonid. Uurides aineid, mida eeldatavasti annustatakse mulda mitmel korral ühel aastaajal, peaks katsekonsentratsioon olema saadud PEC korrumisel suurima eeldatava annustamise arvuga. Kõrgeim uuritav kontsentratsioon ei tohiks siiski olla suurem kui kümnekordne suurim üksikannus. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, tuleks kasutada vähemalt viie kontsentratsiooni geomeetrilist sarja. Uuritavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama EC_x väärtuste kindlaksmääramiseks vajalikku vahemikku.

▼B

1.7. KATSE KÄIK

1.7.1. **Kokkupuute tingimused**1.7.1.1. *Katse- ja kontrollproovid*

Kui uuritakse agrokemikaale, tuleks mullaproovid jagada kolmeks võrdse massiga osaks. Kaks osa segatakse kandeainega, mis sisaldab katseainet, ning kolmas osa segatakse kandeainega, mis ei sisalda katseainet (kontrollproov). On soovitatav kasutada vähemalt kolme paralleelset proovi nii katse- kui kontrollproovide korral. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, tuleks mullaproovid jagada kuueks võrdse massiga osaks. Viis proovi segatakse katseainet sisaldava kandeainega ja kuues proov segatakse kandeainega, mis ei sisalda kemikaali. On soovitatav kasutada kolme paralleelset proovi nii katse- kui kontrollproovide korral. Tuleks tagada katseaine ühtlane jaotus katseproovide hulka kuuluvates mullaproovides. Segamise ajal tuleks vältida mulla pallideks vormimist.

1.7.1.2. *Mullaproovide inkubeerimine*

Mullaproove inkubeeritakse kahel moel: katse- ja kontrollmullaproovide koondproovina või katse ja kontrollmullaproovide üksikute ja võrdse suurusega osaproovide sarjana. Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks katse sooritada vaid üksikute osaproovide sarjana. Kui mullaproovid inkubeeritakse koondproovina, valmistatakse ette katse- ja kontrollmullaproovide suured kogused ning vastavalt vajadusele analüüsivad osaproovid katse käigus. Algselt iga katse- või kontrollproovi kohta ettevalmistatud kogus sõltub osaproovide suurusel, kasutatud paralleelsete proovide arvust ja suurimast eeldatavatest proovide võtmise aegadest. Koondproovina inkubeeritavad mullaproovid tuleks enne osaproovide võtmist hoolega segada. Kui mullaproovid inkubeeritakse üksikute mullaproovide sarjana, jagatakse iga katse- ja kontrollmullaproovide koondproov soovitud arvuks osaproovideks, ning neid kasutatakse vastavalt vajadusele. Katsetest, kus eeldatakse rohkem kui kahte proovide võtmise aega, tuleks ette valmistada piisavalt osaproove kõikide paralleelproovide ja proovivõtuaegade jaoks. Vähemalt kolme uuritava mullaproovi paralleelproovi tuleks inkubeerida aeroobsetes tingimustes (vt punkti 1.7.1.1). Kõikide katsete käigus tuleks kasutada sobivaid mahuteid, milles on piisavalt õhuruumi, et vältida anaeroobsete tingimuste tekkimist. Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks katse sooritada vaid üksikute osaproovide sarjana.

1.7.1.3. *Katsetingimused ja katse kestus*

Katset tehakse pimedas toatemperatuuril 20 ± 2 °C. Mullaproovide niiskusesisaldust tuleks säilitada katse käigus 40–60 % mulla suurimast veemahutavusest (vt punkti 1.6.4.2) vahemikus ± 5 %. Vajaduse korral võib lisada destilleeritud, deioniseeritud vett.

Katsete minimaalne kestus on 28 päeva. Kui uuritakse agrokemikaale, võrreldakse katse- ja kontrollproovides nitraaditekke kiirust. Kui need erinevad 28. päeval rohkem kui 25 %, jätkatakse katset seni, kuni erinevus võrdub või on väiksem kui 25 %, või maksimaalselt 100 päeva, olenevalt sellest, kummaks kulub vähem aega. Muude kui agrokemikaalide puhul lõpetatakse katse pärast 28 päeva. Arvutatakse EC_x väärtused.

▼B**1.7.2. Mullaproovide võtmine ja analüüs****1.7.2.1. Mullaproovide võtmise ajakava**

Kui uuritakse agrokemikaale, analüüsitakse mullaproovides nitraati 0-, 7., 14. ja 28. päeval. Kui on vaja katsed pikendada, tuleks teha täiendavad mõõtmised 14päevaste intervallide tagant pärast 28. päeva.

Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, kasutatakse vähemalt viit katsekonsentratsiooni ja analüüsitakse mullaproovides nitraati kokkupuute perioodi alguses (0-päev) ja lõpus (28. päev). Võib lisada vajaduse korral vahepealse mõõtmise, nt 7. päeval. 28. päeval saadud teavet kasutatakse kemikaali EC_x väärtuse kindlaksmääramiseks. Soovi korral võib kasutada 0-päeval kontrollproovidest saadud andmeid mullas nitraadi algkogusest teatamiseks.

1.7.2.2. Mullaproovide analüüs

Igas katse- ja kontrollproovi paralleelproovis tekkinud nitraadi kogus määratakse kindlaks igal proovivõtuajal. Nitraat ekstraheeritakse mullast proovide raputamise teel sobiva ekstrahendiga, nt kaaliumkloriidilahus (0,1 M). Soovitatav suhe on 5 ml KCl lahust mullaproovi ühe kuivmassi grammi kohta. Ekstraheerimise optimeerimiseks ei tohiks mulla ja ekstrahendi mahutid olla rohkem kui pooltäis. Segu raputatakse 150 rpm 60 minutit. Segusid tsentrifuugitakse või filtreeritakse ning analüüsitakse vedelfaasist nitraat. Osakestevabad vedelikekstraktid võib säilitada enne analüüsi miinus 20 ± 5 °C juures kuni kuus kuud.

2. TULEMUSED**2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Kui katseid tehakse agrokemikaalidega, tuleks registreerida igas mullaproovi paralleelproovis tekkinud nitraadikogus ja tuleks esitada kõikide paralleelproovide keskmised väärtused tabeli kujul. Lämmastiku transformatsiooni kiirusi tuleks hinnata sobivate ja üldiselt heakskiidetud statistiliste meetodite abil (nt F-katse, 5 % olulisussaste). Tekkinud nitraadi koguseid väljendatakse mg nitraadina mulla kuivmassi kg kohta päevas. Nitraadi tekke kiirusi igas katseproovis võrreldakse kiirustega kontrollproovis ning arvutatakse kontrollproovide protsentuaalne hälve.

Kui katseid tehakse muude kui agrokemikaalidega, määratakse kindlaks igas paralleelproovis tekkinud nitraadi kogused ning koostatakse annuse-reaktsiooni kõver EC_x väärtuste hindamiseks. Nitraadikoguseid (s.t mg nitraati mulla kuivmassi kg kohta) katseproovides pärast 28 päeva võrreldakse kontrollproovis olevate nitraadikogustega. Nimetatud andmete põhjal arvutatakse protsentuaalsed inhibitsiooniväärtused iga katsekonsentratsiooni kohta. Need protsendimäärad registreeritakse kontsentratsioonina ning seejärel kasutatakse statistilisi protseduure EC_x väärtuste arvutamiseks. Usalduspiirid ($p = 0,95$) arvutatud EC_x puhul määratakse samuti kindlaks standardprotseduuride abil (10, 11, 12).

Katseained, mis sisaldavad lämmastiku suuri koguseid võivad mõjutada katse käigus tekkivaid nitraadikoguseid. Kui nimetatud aineid uuritakse suurte kontsentratsioonidena (nt kemikaalid, mida eeldatavasti annustatakse korduvalt), peaks katse sisaldama sobivaid kontrolle (s.t mullaproov ja katseaine ilma taimejahuta). Nimetatud kontrollidest saadud andmeid peab võtma arvesse EC_x väärtuste arvutamisel.

▼B

2.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Kui hinnatakse agrokemikaalidega tehtud katsete tulemusi ning nitraaditekke kiiruste erinevus madalamate katseaineannuste (mis vastab suurimale eeldatavale kontsentratsioonile) ja kontrollproovide vahel on võrdne või väiksem kui 25 % mis tahes proovivõtuajal pärast 28 päeva möödumist, saab hinnata, et katseainel ei ole pikaajalist toimet lämmastiku tekkele muldades. Kui muude kemikaalide kui agrokemikaalidega tehtud katsete tulemusi hinnatakse, kasutatakse EC_{50} , EC_{25} ja/või EC_{10} väärtusi.

3. ARUANDLUS

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Kasutatava mulla täielik identifitseerimine, kaasa arvatud:

- geograafiline viide kohale (laiuskraad, pikkuskraad);
- teave koha ajaloo kohta (s.t taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemine, väetistega töötlemine, juhuslik saastamine jne);
- kasutusviis (nt põllumaa, mets jne):
- proovivõtu sügavus (cm);
- liiva-/aleuriidi-/savisisaldus (protsenti kuivmassist);
- pH (vees);
- orgaanilise süsiniku sisaldus (protsenti kuivmassist);
- lämmastikusisaldus (protsenti kuivmassist);
- algne lämmastikusisaldus (mg nitraati kg kuivmassi kohta);
- kationvahetusvõime (mmol/kg);
- mikroobi biomass protsendina orgaanilise süsiniku koguhulgast;
- viide iga parameetri määramismeetodi kohta;
- kogu teave mullaproovide kogumise ja säilitamise kohta;
- vajaduse korral üksikandmed mulla eelinkubeerimise kohta.

Katseaine:

- füüsiline laad ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused;
- vajaduse korral keemilised tunnusandmed, sh struktuurivalem, puhtus (s.t põllukultuuride kaitsevahendite toimeaine protsendimäär), lämmastikusisaldus.

Substraat:

- substraadi allikas;
- koostis (lutsernijahu, lutserni-rohujahu);
- süsiniku-, lämmastikusisaldus (protsenti kuivmassist);
- sõelaava suurus (mm).

▼B

Katsetingimused:

- üksikasjalikud andmed mulla parandamise kohta orgaanilise substraadiga;
- uuritava kemikaali kontsentratsioonide arv ja vajaduse korral valitud kontsentratsioonide põhjendus;
- üksikasjalikud andmed katseaine mulda annustamise kohta;
- inkubatsioonitemperatuur;
- mulla niiskusesisaldus katse alguses ja kestel;
- kasutatav mulla inkubeerimismeetod (koondproovina või üksikute osaproovide sarjana);
- paralleelsete proovide arv;
- proovivõtuajad;
- nitraadi mullast ekstraheerimise meetod.

Tulemused:

- analüüsimeetod ja -seade, mida kasutatakse nitraadi analüüsiks;
- andmed tabeli kujul, sh nitraadi mõõtmiste üksikud ja keskvaartused;
- katse- ja kontrollproovide paralleelproovide vaheline muutus;
- arvutustega tehtud paranduste selgitused, kui on vaja;
- nitraadi tekke kiiruse protsentuaalne muutus igal proovivõtukorral või vajaduse korral EC_{50} väärtus 95 % usaldusvahemikus, muud EC_x väärtused (s.t EC_{25} või EC_{10}) usaldusvahemikes ning annuse-reaktsiooni kõver;
- tulemuste statistiline töötlemine;
- kogu teave ja vaatlused, mis aitaksid tõlgendada tulemusi.

4. **VIITED**

- 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 January 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. MULLAMIKROOBID: SÜSINIKU TRANSFORMATSIOONI KATSE****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 217 (2000).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod kirjeldab laborimeetodit, mis on välja töötatud selleks, et uurida põllukultuuride kaitsevahendite ja muude võimalike kemikaalide pikaajalisi mõjusid mullamikroobide süsiniku transformatsioonile ühekordse kokkupuute järel. Katse põhineb peamiselt Euroopa ja Vahemere taimekaitseorganisatsiooni soovitusel (1). Samuti võetakse arvesse muid juhised, sh Saksa Biologische Bundesanstalt (2), USA Keskkonnakaitseagentuuri (3) ja SETACi (4) juhiseid. Käesolevas katses kasutatavate mullaproovide arvu ja tüüpide osas lepiti kokku mulla ja sedimentide valikut käsitlevas OECD töörühmas, mis tuli kokku Belgirates Itaalias 1995. aastal (5). Mullaproovide kogumist, käsitlemist ja säilitamist käsitlevad soovitused põhinevad ISO juhisdokumendil (6) ja Belgirate töörühma soovitusel.

Katseainete toksiliste omaduste hindamisel võib osutada vajalikuks määrata kindlaks mõjud mulla mikroobsele aktiivsusele, nt kui vajatakse andmeid põllukultuuride kaitsevahendite võimalike kõrvalmõjude kohta mulla mikrofloora suhtes või kui eeldatakse mullamikroobide kokkupuudet muude kemikaalidega kui põllukultuuride kaitsevahendid. Süsiniku transformatsiooni katse tehakse selleks, et kindlaks määrata selliste kemikaalide mõju mulla mikrofloorale. Kui uuritakse agrokemikaale (nt põllukultuuride kaitsevahendid, väetised, metsanduskemikaalid), sooritatakse nii süsiniku transformatsiooni kui ka lämmastiku transformatsiooni katse. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, piisab lämmastiku transformatsiooni katses. Kui selliste kemikaalide lämmastiku transformatsiooni katses saadud EC₅₀ väärtused on kaubanduslike nitrifikatsiooniinhibiitorite (nt nitrapüriin) esindavas vahemikus, saab täiendava teabe kogumiseks teha süsiniku transformatsiooni katse.

Muld koosneb elusatest ja elututest koostisosadest, mis eksisteerivad keerukates ja heterogeenseses segudes. Mikroobid mängivad tähtsat rolli viljaka mulla orgaanilise aine hajutamisel ja muutmisel, ning mõned liigid mõjutavad mulla viljakuse erinevaid aspekte. Kõik nimetatud biokeemiliste protsesside pikaajalised häired võivad häirida toitaineringlust ja see võib muuta mulla viljakust. Süsiniku ja lämmastiku transformatsioon toimub kõikides viljakates muldades. Kuigi nimetatud protsesse põhjustav mikroobikogum on mullati erinev, on transformatsioonirajad oma olemuselt samad.

▼B

Käesolev katsemeetod on välja töötatud selleks, et avastada aine pikaajalisi negatiivseid mõjusid aeroobsete pinnamuldade süsiniku transformatsiooni protsessile. Katse on tundlik süsiniku transformatsioonis osaleva mikroobikogumi suuruse ja tegevuse muutuste suhtes, kuna katses lastakse neil mikroobikogumitel osa saada nii keemilisest stressist kui ka süsinikupuudusest. Kasutatakse liivast mulda, mille orgaanilise aine sisaldus on madal. Seda mulda töödeldakse katseainega ja inkubeeritakse tingimustes, mis võimaldavad kiiret mikroobide ainevahetust. Nimetatud tingimustes on kiirelt vähenenud kergesti kättesaadava süsiniku allikad mullas. See põhjustab süsiniku puudust, mis tapab mikroobirakud ning kutsub esile puhkeperioodi ja/või sporulatsiooni. Kui katset tehakse kauem kui 28 päeva, saab mõõta nimetatud reaktsiooni summat (töötlemata mulla) kontrollproovides metaboolselt aktiivse mikroobi biomassi järkjärgulise vähenemisenä (7). Kui süsinikupuuduses vaevlevas mullas olevat biomassi mõjutab katsetingimustes kemikaali esinemine, ei saa see pöörduda tagasi samale tasemele nagu kontrollproovis olev biomass. Seetõttu katseaine põhjustatud häireid mis tahes ajal katse käigus kestavad tihti kuni katse lõpuni.

Käesoleva katsemeetodi aluseks olevad katsed töötati välja peamiselt ainete jaoks, mille pinnasesse jõudvat kogust saab ennustada. Sellised ained on näiteks põllukultuuride kaitsevahendid, mille annustamine põllule on teada. Agrokemikaalide puhul piisab sellest, kui uuritakse kahte annust oletatava annustamissageduse osas. Agrokemikaalide puhul saab uurida toimeaineid (a.i.) või preparaate. Katse ei piirdu siiski vaid prognoositavaid arvestuskontsentratsioonide omavate kemikaalidega. Muutes nii pinnasesse annustatavaid katseaine koguseid kui ka seda, kuidas andmeid hinnatakse, saab kasutada katset kemikaalide puhul, mille pinnasesse jõudev kogus ei ole teada. Seega määratakse kindlaks muude kemikaalide kui agrokemikaalid puhul kontsentratsiooni ridade mõjud süsiniku transformatsioonile. Nimetatud katsetest saadud andmeid kasutatakse annuse-reaktsiooni kõvera koostamiseks ja EC_x väärtuste arvutamiseks, milles x on mõju protsendina.

1.2. MÕISTED

Süsiniku transformatsioon – orgaanilise aine lagundamine mikroorganismide poolt anorgaaniliseks lõppsaaduseks, süsinikdioksiidiks.

EC_x (efektiivkontsentratsioon) – mullas esineva katseaine kontsentratsioon, mis tõkestab süsiniku transformatsiooni süsinikdioksiidiks x protsendiga.

EC_{50} (efektiivkontsentratsiooni mediaan) – mullas esineva katseaine kontsentratsioon, mis tõkestab süsiniku transformatsiooni süsinikdioksiidiks 50 protsendiga.

1.3. VÕRDLUSAINED

Puuduvad.

▼B

1.4. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Sõelutud mulda töödeldakse kas katseainega või jäetakse töötlemata (kontroll). Kui uuritakse agrokemikaale, on soovitatav kasutada vähemalt kahte katsekonsentratsiooni ja need tuleks valida suurima kontsentratsiooni suhtes, mis eeldatavasti esineb põllul. Pärast 0-, 7., 14. ja 28. inkubeerimispäeva segatakse katse- ja kontrollmullaproovid glükoosiga ning glükoosi põhjustatud hingamiskiirust mõõdetakse järjestikusel 12 tunnil. Hingamiskiirusi väljendatakse vabanenud süsinikdioksiidina (mg süsinikdioksiidi mulla kuivmassi kg kohta tunnis) või tarbitud hapnikuna (mg hapnikku kg mulla kohta tunnis). Keskmist hingamiskiirust katseproovides võrreldakse sama hingamiskiirusega kontrollproovides ning arvutatakse katseproovi ja kontrollproovi vaheline protsentuaalne hälve. Kõik katsed kestavad vähemalt 28 päeva. Kui 28. päeval on katse- ja kontrollproovide vahelised erinevused võrdsed või suuremad kui 25 %, jätkatakse mõõtmisi 14päevaste intervallidega kuni maksimaalselt 100 päeva. Kui uuritakse muid kemikaale kui agrokemikaale, lisatakse mullaproovidele katseaine kontsentratsioonide sari ning mõõdetakse glükoosi põhjustatud hingamiskiirusi (s.t tekkinud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku koguste keskmine) pärast 28 päeva möödumist. Kontsentratsioonide sarja käsitlevate katsete tulemusi analüüsitakse regressioonimudelit kasutades, ning arvutatakse EC_X väärtused (s.t EC_{50} , EC_{25} ja/või EC_{10}). Vt mõisteid.

1.5. KATSE VALIIDSUS

Agrokemikaalidega tehtud katsete tulemuste hindamine põhineb suhtelistelt väikestel erinevustel (s.t keskmine väärtus on ± 25 %) kontroll- ja katsemullaproovides vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku vahel, et kontrollproovide suured muutused võivad viia väärate tulemusteni. Seetõttu peaksid paralleelsete kontrollproovide vahelised muutused olema väiksemad kui ± 15 %.

1.6. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.6.1. Seadmed

Katsetes kasutatakse mahuteid, mis on valmistatud keemiliselt inertest materjalist. Mahutite mahutavus peaks vastama mullaproovide inkubeerimisprotseduurile, s.t üksikute mullaproovide massina või sarjana inkubeerimine (vt punkti 1.7.1.2). Tuleks tagada, et veekadu oleks katse käigus minimaalne ja gaasivahetus oleks võimalik (nt võib katsemahutid katta perforatsiooniga polüetüleenkillega). Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks kasutada mastabeeritavaid ja gaasi-kindlaid mahuteid. Need peaksid olema sellise suurusega, et ligikaudu üks neljandik nende mahust täidetakse mullaprooviga.

Glükoosi põhjustatud hingamise kindlaksmääramisel on nõutavad inkubeerimissüsteemid ja süsinikdioksiidi tootmise või hapniku tarbimise mõõtmisseadmed. Selliste süsteemide ja seadmete kohta käivad näiteid võib leida kirjandusviidetest (8, 9, 10, 11).

1.6.2. Mullaliikide valik ja arv

Kasutatakse ühte mullaliiki. Soovitavad mullaomadused on järgmised:

— liivisisaldus: vähemalt 50 % ja kuni 75 %,

▼B

- pH: 5,5–7,5;
- orgaanilise süsiniku sisaldus: 0,5–1,5 %;
- mikroobi biomassi tuleks mõõta (12, 13) ja selle süsinikusisaldus peaks olema vähemalt 1 % mulla orgaanilise süsiniku koguhulgast.

Enamikul juhtudel nimetatud omadustega muld esindab halvimat juhtu, kuna uuritava kemikaali absorptsioon on minimaalne ja selle kättesaadavus mikrofloorale on suurim. Sellest tulenevalt ei ole katsed muude mullaliikidega üldiselt vajalikud. Teatud juhtudel, nt kui katseainet eeldatavasti kasutatakse peamiselt muldades, nt happelised metsamullad, või kui kemikaalid on elektrostaatiliselt laetud, võib osutada vajalikuks kasutada ka muud mullaliiki.

1.6.3. Mullaproovide kogumine ja säilitamine

1.6.3.1. Kogumine

Üksikasjalik teave proovikogumiskoha ajaloo kohta peaks olema kättesaadav. Üksikasjade hulka kuuluvad täpne asukoht, taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemise kuupäevad, orgaaniliste ja anorgaaniliste väetistega töötlemine, bioloogiliste materjalide lisamine või juhuslik saastumine. Mullaproovide kogumiseks valitud kohta peaks saama kasutada pikka aega. Sobivad on püsikarjamaad, üheaastaste teraviljakultuuridega (v.a mais) põllud või tihedalt külvatud haljaskesa. Valitud proovivõtukohta ei tohiks töödelda põllukultuuride kaitsevahenditega vähemalt ühe aasta jooksul enne proovide võtmist. Samuti ei tohiks kasutada orgaanilisi väetisi vähemalt kuus kuud. Mineraalväetiste kasutamine on lubatud üksnes siis, kui see vastab põllukultuuride nõuetele ja mullaproove ei tohiks võtta vähemalt kolm kuud pärast väetise kasutamist. Biotsiidi mõjuga (nt kaltsiumtsüaanamiid) väetistega töödeldud mulla kasutamist tuleks vältida.

Proovide võtmist tuleks vältida pikkade (rohkem kui 30 päeva) põua- või vettimisperioodide ajal või vahetult pärast seda. Küntud muldade puhul tuleks proovid võtta 0–20 cm sügavuselt. Rohumaade (karjamaade) või muude muldade puhul, kui ei ole pikka aega küntud (vähemalt ühe kasvuperioodi vältel), peaks proovivõtu suurim sügavus olema veidi rohkem kui 20 cm (nt kuni 25 cm). Mullaproovid tuleks transportida mahutites ja temperatuuridel, mis tagavad, et algseid mullaomadusi ei muudeta oluliselt.

1.6.3.2. Säilitamine

Värskelt põllult kogutud mulla kasutamine on eelistatud. Kui ei säilitamine laboris on vältimatu, võib mullaproove säilitada pimedas temperatuuril 4 ± 2 °C maksimaalselt kolm kuud. Mullaproovide säilitamise ajal tuleb tagada aeroobsed tingimused. Kui mullaproovid kogutakse piirkondadest, kus maapind on vähemalt kolm kuud aastas külmunud, saab kaaluda nende säilitamist kuueks kuuks miinus 18 °C juures. Säilitatud mullaproovide mikroobi biomassi mõõdetakse enne igat katset ja biomassis peaks olema süsinikku vähemalt 1 % mulla orgaanilise süsiniku kogusisaldusest (vt punkti 1.6.2).

▼B**1.6.4. Mullaproovide käsitlemine ja katseks ettevalmistamine****1.6.4.1. Eelinkubeerimine**

Kui mullaproove säilitati (vt punkte 1.6.4.2 ja 1.7.1.3), on soovitatav eelinkubeerida 2–28 päeva. Mulla temperatuur ja niiskusesisaldus eelinkubeerimise ajal peaksid olema samasugused kui need, mida kasutati katses (vt punktid 1.6.4.2 ja 1.7.1.3).

1.6.4.2. Füüsikalise-keemilised omadused

Muld puhastatakse käsitsi suurtest objektidest (nt kivid, taimeosad jne) ning seejärel märgsõelutakse ilma liigselt kuivatamata 2 mm või sellest väiksemateks osakeste suuruseks. Mullaproovi niiskusesisaldust peaks reguleerima destilleeritud või deioniseeritud veega 40–60 % maksimaalse veemahutavuseni.

1.6.5. Katseaine ettevalmistamine mulda annustamiseks

Katseainet annustatakse tavaliselt kandeaine abil. Kandeaine võib olla vesi (veelahustuvate ainete puhul) või inertne tahke aine, nt peen kvartslüv (mille osakeste suurus on 0,1–0,5 mm). Vedelaid, veest erinevaid kandeaineid (nt orgaanilisi lahusteid nagu atsetoon, kloroform) tuleks vältida, kuna nad võivad kahjustada mikrofloorat. Kui kasutatakse kandeainena liiva, saab selle katta katseainega, mis on sobivas lahustis lahustatud või suspendeeritud. Sellisel juhul tuleks lahusti eemaldada aurustumise teel enne mullaga segamist. Katseaine optimaalseks jaotumiseks mullas on soovitatav suhe 10 g liiva ühe kilogrammi mulla kohta (kuivmass). Kontrollproove töödeldakse sarnase veehulgaga ja/või üksnes kvartslüvaga.

Kui uuritakse lenduvaid kemikaale, tuleks vältida kadusid töötlemise ajal niipalju kui võimalik ja tuleks püüda tagada ühtlane jaotus mullas (nt katseainet tuleks injekteerida mulda mitmes kohas).

1.6.6. Uuritavad kontsentratsioonid

Kui uuritakse põllukultuuride kaitsevahendeid või muid prognoositavaid arvestuskontsentratsioone omavaid kemikaale, tuleks kasutada vähemalt kahte kontsentratsiooni. Väiksem kontsentratsioon peaks kajastama vähemalt katseaine kasutamisel mulda jõudvat suurimat eeldatavat kogust ning suurem kontsentratsioon peaks olema väiksema kontsentratsiooni kordne. Mulda lisatavate katseainete kontsentratsioonid arvutatakse eeldusel, et aine imendub ühtlaselt 5 cm sügavusele ja mulla lasuvustihedus on 1,5. Agrokemikaalide puhul, mida annustatakse otse mulda, või kemikaalide puhul, mille mulda jõudvat kogust saab ennustada, on soovitatavad katsekonsentratsioonid suurimad arvutuskonsentratsioonid (PEC) ja neist viis korda suuremad kontsentratsioonid. Uurides aineid, mida eeldatavasti annustatakse mulda mitmel korral ühel aastaajal, peaks katsekonsentratsioon olema saadud PEC korrutamisel suurima eeldatava annustamise arvuga. Kõrgeim uuritav kontsentratsioon ei tohiks siiski olla suurem kui kümnekordne suurim üksikannus.

Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, tuleks kasutada vähemalt viie kontsentratsiooni geomeetrilist sarja. Uuritavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama EC_x väärtuste kindlaksmääramiseks vajalikku vahemikku.

▼B

1.7. KATSE KÄIK

1.7.1. **Kokkupuute tingimused**1.7.1.1. *Katse- ja kontrollproovid*

Kui uuritakse agrokemikaale, tuleks mullaproovid jagada kolmeks võrdse massiga osaks. Kaks osa segatakse kandeainega, mis sisaldab katseainet, ning kolmas osa segatakse kandeainega, mis ei sisalda katseainet (kontrollproov). On soovitatav kasutada vähemalt kolme paralleelset proovi nii katse- kui kontrollproovide puhul. Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, tuleks mullaproovid jagada kuueks võrdse massiga osaks. Viis proovi segatakse katseainet sisaldava kandeainega ja kuues proov segatakse kandeainega, mis ei sisalda kemikaali. On soovitatav kasutada kolme paralleelset proovi nii katse- kui kontrollproovide korral. Tuleks tagada katseaine ühtlane jaotus katseproovide hulka kuuluvates mullaproovides. Segamise ajal tuleks vältida mulla pallideks vormimist.

1.7.1.2. *Mullaproovide inkubeerimine*

Mullaproove inkubeeritakse kahel moel: katse- ja kontrollmullaproovide koondproovina või katse ja kontrollmullaproovide üksikute ja võrdse suurusega osaproovide sarjana. Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks katse sooritada vaid üksikute osaproovide sarjana. Kui mullaproovid inkubeeritakse koondproovina, valmistatakse ette katse- ja kontrollmullaproovide suured kogused ning vastavalt vajadusele analüüsitavad osaproovid katse käigus. Algselt iga katse- või kontrollproovi kohta ettevalmistatud kogus sõltub osaproovide suurusel, kasutatud paralleelsete proovide arvust ja suurimatest eeldatavatest proovide võtmise aegadest. Koondproovina inkubeeritavad mullaproovid tuleks enne osaproovide võtmist hoolega segada. Kui mullaproovid inkubeeritakse üksikute mullaproovide sarjana, jagatakse iga katse- ja kontrollmullaproovide koondproov soovitud arvuks osaproovideks, ning neid kasutatakse vastavalt vajadusele. Katsetest, kus eeldatakse rohkem kui kahte proovide võtmise aega, tuleks ette valmistada piisavalt osaproove kõikide paralleelproovide ja proovivõtuaegade jaoks. Vähemalt kolme uuritava mullaproovi paralleelproovi tuleks inkubeerida aeroobsetes tingimustes (vt punkti 1.7.1.1). Kõikide katsete käigus tuleks kasutada sobivaid mahuteid, milles on piisavalt õhuruumi, et vältida anaeroobsete tingimuste tekkimist. Kui uuritakse lenduvaid aineid, tuleks katse sooritada vaid üksikute osaproovide sarjana.

1.7.1.3. *Katsetingimused ja katse kestus*

Katset tehakse pimedas toatemperatuuril 20 ± 2 °C. Mullaproovide niiskusesisaldust tuleks säilitada katse käigus 40–60 % mulla suurmast veemahutavusest (vt punkti 1.6.4.2) vahemikus ± 5 %. Vajaduse korral võib lisada destilleeritud, deioniseeritud vett.

Katsete minimaalne kestus on 28 päeva. Kui uuritakse agrokemikaale, võrreldakse katse- ja kontrollproovides vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku koguseid. Kui need erinevad 28. päeval rohkem kui 25 %, jätkatakse katset seni, kuni erinevus võrdub või on väiksem kui 25 %, või maksimaalselt 100 päeva, olenevalt sellest, kummaks kulub vähem aega. Muude kui agrokemikaalide puhul lõpetatakse katse pärast 28 päeva. 28. päeval määratakse kindlaks katse- ja kontrollmullaproovides vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku kogused ja arvutatakse EC_x väärtused.

▼B**1.7.2. Mullaproovide võtmine ja analüüs****1.7.2.1. Mullaproovide võtmise ajakava**

Kui uuritakse agrokemikaale, analüüsitakse mullaproovides glükoosi põhjustatud hingamiskiirusi 0., 7., 14. ja 28. päeval. Kui on vaja katset pikendada, tuleks teha täiendavad mõõtmised 14päevaste intervallide tagant pärast 28. päeva.

Kui uuritakse muid kui agrokemikaale, kasutatakse vähemalt viit katsekontsentratsiooni ja analüüsitakse mullaproovides glükoosi põhjustatud hingamist kokkupuute perioodi alguses (0-päev) ja lõpus (28. päev). Võib lisada vajaduse korral vahepealse mõõtmise, nt 7. päeval. 28. päeval saadud teavet kasutatakse kemikaali EC_x väärtuse kindlaksmääramiseks. Soovi korral võib kasutada 0-päeval kontrollproovidest saadud andmeid mullas metaboolselt aktiivse mikroobi biomassi algkogustest teatamiseks (12).

1.7.2.2. Glükoosi põhjustatud hingamiskiiruste mõõtmine

Iga katseproovi ja kontrollproovi paralleelse proovi glükoosi põhjustatud hingamiskiirus määratakse kindlaks igal proovivõtukorral. Mullaproovidesse segatakse selline glükoosihulk, millest piisab vahetu suurima hingamisreaktsiooni põhjustamiseks. Nimetatud mullaproovis suurima hingamisreaktsiooni põhjustamiseks vajaliku glükoosi hulga saab kindlaks määrata eelkatses, kasutades glükoosi kontsentratsioonide sarja (14). Liivaste muldade puhul, mille orgaanilise süsiniku sisaldus on 0,5–1,5 %, piisab tavaliselt 2 000–4 000 mg glükoosist mulla kuivmassi kg kohta. Glükoosi võib jahvatada pulbriks koos puhta kvartsiivaga (10 g liiva mulla kuivmassi kg kohta) ja segada ühtlaselt mullaga.

Glükoosiga parandatud mullaproove inkubeeritakse sobivas hingamiskiiruste mõõtmiseadmes kas pidevalt, kord tunnis või kord kahe tunni jooksul (vt punkti 1.6.1) 20 ± 2 °C juures. Vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku mõõdetakse 12 järjestikusel tunnil ning mõõtmisi tuleks alustada nii ruttu kui võimalik, s.t ükskaks tundi pärast glükoosiga täiendamist. Mõõdetakse vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku üldkoguseid 12 tunni jooksul ja määratakse keskmised hingamiskiirused.

2. ANDMED**2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Kui katseid tehakse agrokemikaalidega, tuleks registreerida igas mullaproovi paralleelproovis vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku kogus ja tuleks esitada kõikide paralleelproovide keskmised väärtused tabeli kujul. Süsiniku transformatsiooni kiirusi tuleks hinnata sobivate ja üldiselt heakskiidetud statistiliste meetodite abil (nt F-katse, 5 % olulisusaste). Glükoosi põhjustatud hingamiskiirusi väljendatakse mg süsinikdioksiidina mulla kuivmassi kg kohta tunnis või mg hapnikuna mulla kuivmassi kg kohta tunnis. Keskmist süsinikdioksiidi tekkekiirust või keskmist hapniku tarbimiskiirust igas katseproovis võrreldakse samade kiirustega kontrollproovis ning arvutatakse katse- ja kontrollproovi vaheline protsentuaalne hälve.

▼B

Kui katseid tehakse muude kui agrokemikaalidega, määratakse kindlaks igas paralleelproovis vabanenud süsinikdioksiidi või tarbitud hapniku kogused ning koostatakse annuse-reaktsiooni kõver EC_x väärtuste hindamiseks. Katseproovi glükoosi põhjustatud hingamiskiirusi (s.t mg süsinikdioksiidi mulla kuivmassi kg kohta tunnis või mg hapnikku mulla kuivmassi kg kohta tunnis) pärast 28 päeva möödumist võrreldakse samade kiirustega kontrollproovis. Nimetatud andmete põhjal arvutatakse protsentuaalsed inhibitsiooniväärtused iga katsekonsentratsiooni kohta. Need protsendimäärad registreeritakse kontsentratsioonina ning seejärel kasutatakse statistilisi protseduure EC_x väärtuste arvutamiseks. Usalduspiirid ($p = 0,95$) arvatud EC_x puhul määratakse samuti kindlaks standardprotseduuride abil (15, 16, 17).

2.2. TULEMUSTE TÕLGENDAMINE

Kui hinnatakse agrokemikaalidega tehtud katsete tulemusi ning hingamiskiiruste erinevus madalamate katseaineannuste (mis vastab suurimale eeldatavale kontsentratsioonile) ja kontrollproovide vahel on võrdne või väiksem kui 25 % mis tahes proovivõtujal pärast 28 päeva möödumist, saab hinnata, et katseaine ei oma pikaajalist toimet süsinikdioksiidi tekkele muldades. Kui muude kemikaalide kui agrokemikaalidega tehtud katsete tulemusi hinnatakse, kasutatakse EC_{50} , EC_{25} ja/või EC_{10} väärtusi.

3. ARUANDLUS

3.1 KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Kasutatava mulla täielik identifitseerimine, kaasa arvatud:

- geograafiline viide kohale (laiuskraad, pikkuskraad);
- teave koha ajaloo kohta (s.t taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemine, väetistega töötlemine, juhuslik saastamine jne);
- kasutusviis (nt põllumaa, mets jne);
- proovivõtu sügavus (cm);
- liiva-/aleuriidi-/savisisaldus (protsenti kuivmassist);
- pH (vees);
- orgaanilise süsiniku sisaldus (protsenti kuivmassist);
- lämmastikusisaldus (protsenti kuivmassist);
- kationvahetusvõime (mmol/kg);
- algne mikroobi biomass protsendina orgaanilise süsiniku koguhulgast;
- viide iga parameetri määramismeetodi kohta;
- kogu teave mullaproovide kogumise ja säilitamise kohta;
- vajaduse korral üksikasjalikud andmed mulla eelinkubeerimise kohta.

▼ B

Katseaine:

- füüsiline laad ja vajaduse korral füüsikalis-keemilised omadused;
- vajaduse korral keemilised tunnusandmed, sh struktuurivalem, puhtus (s.t põllukultuuride kaitsevahendite toimeaine protsendimäär), lämmastiksisaldus.

Katsetingimused:

- üksikasjalikud andmed mulla parandamise kohta orgaanilise substraadiga;
- uuritava kemikaali kontsentratsioonide arv ja vajaduse korral valitud kontsentratsioonide põhjendus;
- üksikasjalikud andmed katseaine mulda annustamise kohta;
- inkubatsioonitemperatuur;
- mulla niiskusesisaldus katse alguses ja kestel;
- kasutatav mulla inkubeerimismeetod (koondproovina või üksikute osaproovide sarjana);
- paralleelsete proovide arv;
- proovivõtuajad.

Tulemused:

- hingamiskiiruste mõõtmismeetod ja -seade;
- andmed tabeli kujul, sh süsinikdioksiidi või hapniku üksikud ja keskmised väärtused;
- katse- ja kontrollproovide paralleelproovide vaheline muutus;
- arvutustega tehtud paranduste selgitused, kui on vaja;
- glükoosi põhjustatud hingamiskiiruse protsentuaalne muutus igal proovivõtukorral või vajaduse korral EC_{50} väärtus 95 % usaldusvahemikus, muud EC_x väärtused (s.t EC_{25} või EC_{10}) usaldusvahemikes ning annuse-reaktsiooni kõver;
- vajaduse korral tulemuste statistiline töötlemine;
- kogu teave ja vaatlused, mis aitaksid tõlgendada tulemusi.

4. **VHITED**

- 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 Ns 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) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A, and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. *Plant and Soil*, 116: 77-81.
- 12) ISO 14240-1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method.
- 13) ISO 14240-2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method.
- 14) Malkomes, H.-P. (1986). EinfluE 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. AEROOBNE JA ANAEROOBNE TRANSFORMATSIOON MULLAS****1. MEETOD**

Käesolev katsemeetod lähtub juhendist OECD TG 307 (2002).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesolev katsemeetod põhineb olemasolevatel juhenditel (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Käesolevas katsemeetodis kirjeldatud meetod töötati välja kemikaalide aeroobse ja anaeroobse transformatsiooni hindamiseks mullas. Katsete abil määratakse i) katseaine transformatsiooni kiirus ja ii) selliste transformatsioonisaaduse laad, mida taimed ja mullaorganismid saavad mõjutada, ning nende moodustumis- ja hävimiskiirus. Sellised uuringud tehakse kemikaalidega, mida levitatakse otse maapinda või mis tõenäoliselt jõuavad mullakeskkonda. Selliste laboriuuringute tulemusi võib samuti kasutada vastavates väliuurin-gutes kasutatud proovivõtu- ja analüüsiprotokollide koostamisel.

Transformatsiooniteede hindamiseks piisab üldjuhul aeroobsest ja anaeroobsest uuringust ühe pinnasetüübiga (8, 10, 11). Transformatsioonikiirused tuleks kindlaks määrata veel lisaks vähemalt kolmes pinnasetüübis (8, 10).

Käesolevas katses kasutatavate pinnaste arvu ja tüüpide osas lepitati kokku pinnase ja sedimentide valikut käsitlevas OECD tööruhmas, mis tuli kokku Belgirates Itaalias 1995. aastal (10). Uuritavad pinnasetüübid peaksid esindama keskkonnatingimusi, kus katseainet kasutatakse või kus vabastamised toimuvad. Näiteks, kemikaale, mis võidakse vabastada subtroopilises kuni troopilises kliimas, tuleks uurida Ferrasoli või Nitosoliga (FAO-süsteem). Töörühm tegi samuti soovitusi seoses mullaproovide kogumise, käsitlemise ja säilitamisega, vastavalt ISO juhendile (15). Käesolevas meetodis võetakse samuti arvesse riisi kasvatamisel kasutatavaid pinnaseid.

1.2. MÕISTED

Katseaine – mis tahes aine, kas lähteühend või vastav transformatsioonisaadus.

Transformatsioonisaadused – kõik katseaine biotilistes või abiootilistes transformatsioonireaktsioonides saadud ained, kaasa arvatud CO₂ ja tooted, mis on seotud jääkides.

Seotud jäägid – pinnases, taimedes või loomades olevad ühendid, mis ekstraheerimise järel säilivad matriitsis lähteainena või selle metaboliidi(metaboliitide)/transformatsioonisaadustena. Ekstraheerimismeetod ei tohiks oluliselt muuta ühendit ennast või matriitsi struktuuri. Sideme olemust saab selgitada osaliselt matriitsi muutva ekstraheerimismeetodi ja täiustatud analüüsimeetodite abil. Täna seni, näiteks, on sel viisil kindlaks tehtud kovalentsed ioonsidemed ja sorptsioonsidemed ning „lõksud”. Üldiselt vähendab seotud jääkide teke oluliselt bioloogilist kättesaadavust ja bioloogilist omastatavust (12) 1984. aasta IUPAC muudatus (13).

Aeroobne transformatsioon – reaktsioonid, milles osaleb molekulaarne hapnik (14).

▼B

Anaeroobne transformatsioon – reaktsioonid, milles ei osale molekulaarne hapnik (14).

Pinnas – väikeste (peamiselt mikro)organismide poolt orgaaniliseks muudetav segu mineraalsetest ja orgaanilistest keemilistest koostisainetest, mis hiljem sisaldab kõrge süsiniku- ja lämmastikusisaldusega ning suure molekulmassiga ühendeid. Pinnast võib töödelda kahes eri seisundis:

- a) looduspärane, nagu see on aja jooksul arenenud pinnasetüüpide erinevateks iseloomulikeks kihtideks;
- b) häiritud, nagu see on tavaliselt esineb viljeluspõldudel või käesolevas meetodis kasutamiseks kaevatud proovides (14).

Mineralisatsioon – orgaanilise ühendi täielik lagunemine CO₂-ks ja H₂O-ks aeroobsetes tingimustes ning CH₄-ks, CO₂-ks ja H₂O-ks anaeroobsetes tingimustes. Käesoleva katsemeetodi kontekstis, kui kasutatakse ¹⁴C-märgistatud ühendit, tähendab mineralisatsioon ulatuslikku lagundamist, mille käigus märgistatud süsinikuaatom oksüdeerub ning vabaneb sobiv kogus ¹⁴CO₂ (14).

Poolestusaeg – t_{0,5} on aeg, mis kulub katseaine 50 %liseks transformatsiooniks, kui transformatsiooni saab kirjeldada esimese astme kineetika abil; poolestusaeg ei sõltu kontsentratsioonist.

DT₅₀ (hävimisaeg 50) – aeg, mille jooksul katseaine kontsentratsiooni vähendatakse 50 % võrra; see on erinev poolestusajast t_{0,5}, mil transformatsioon ei järgi esimese astme kineetikat.

DT₇₅ (hävimisaeg 75) – aeg, mille jooksul katseaine kontsentratsiooni vähendatakse 75 % võrra.

DT₉₀ (hävimisaeg 90) – aeg, mille jooksul katseaine kontsentratsiooni vähendatakse 90 % võrra.

1.3. VÕRDLUSAINED

Võrdlusaineid tuleks kasutada transformatsioonisaaduste iseloomustamiseks ja/või identifitseerimiseks spektroskoopiliste ja kromatograafiliste meetodite abil.

1.4. KATSE KOHALDAMISALA

Meetodit kohaldatakse kõikide keemiliste ainete suhtes (märgistamata või radiomärgistatud, mille kohta on olemas piisavalt täpne ja tundlik analüüsimeetod. See on kohaldatav kergelt lenduvate, mitte-lenduvate, veelahustuvate või vees mittelahustuvate ühendite suhtes. Katset ei kohaldata kemikaalide suhtes, mis kergesti lenduvad pinnasest (nt fumigandid, orgaanilised lahustid) ja seega ei saa seda hoida pinnases käesolevates katsemeetodites.

▼B

1.5. TEAVE KATSEAINE KOHTA

Märgistamata või märgistatud katseainet saab kasutada transformatsioonikiiruse mõõtmiseks. Märgistatud materjal on nõutav transformatsioonitee uurimiseks ja ainetaseme määramiseks. ^{14}C -märgistust soovitatakse, kuid muude isotoopide (näiteks ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P) kasutamine võib olla samuti kasulik. Niipalju kui võimalik tuleks märgistus asetada molekuli kõige stabiilsemale osa(de) külge ⁽¹⁾. Katseaine puhtus peaks olema vähemalt 95 %.

Enne pinnases aeroobset ja anaeroobset transformatsiooni käsitleva katse tegemist peaks olema katseaine kohta kättesaadaval järgmine teave:

- a) lahustuvus vees (meetod A.6);
- b) lahustuvus orgaanilistes lahustites;
- c) aururõhk (meetod A.4) ja Henry konstant;
- d) n-oktanolii/vee jaotustegur (meetod A.8);
- e) keemiline stabiilsus pimedas (hüdrolüüs) (meetod C.7);
- f) pK_a , kui molekulil on kaldumus protoneerumisele või deprotoneerumisele (OECD juhend 112) (16).

Muu vajalik teave võib sisaldada andmeid katseaine mürgisuse kohta mullamikroobide suhtes (katsemeetodid C.21 ja C.22) (16).

Katseaine ja selle transformatsioonisaaduste kvantifitseerimise ja identifitseerimise analüüsimeetodid (sh ekstraheerimis- ja puhastamisemeetodid) peaksid olema kättesaadavad.

1.6. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Mullaproove töödeldakse katseainega ja inkubeeritakse pimedas Erlenmeyer kolbides või möödavoolusüsteemides kontrollitud laboritingimustes (konstantse temperatuuri ning pinnaseniiskuse juures). Pärast sobivaid ajavahemikku ekstraheeritakse mullaproovid ja neid analüüsitakse lähteaine ja transformatsioonisaaduste suhtes. Lenduvasaadused kogutakse samuti analüüsiks sobivate absorptsiooniseadmete abil. Kasutades ^{14}C -märgistusega materjali, saab mõõta katseaine erinevaid mineralisatsioonikiiruseid eraldunud $^{14}\text{CO}_2$ kinni püüdes, ning saab määrata ainetaseme, sh pinnases seotud jäägid.

1.7. KVALITEEDIKRITEERIUMID

1.7.1. Saagis

Vähemalt kahe mullaproovi ekstraheerimine ja analüüs kohe katseaine lisamise järel annab esimesi märke analüüsimeetodi korratavuse kohta ning katseaine manustamise ühtsuse kohta. Saagised katse hili-sematelt etappidelt on saadud vastavalt ainetasemetelt. Saagised peaksid jääma vahemikku 90–110 % märgistatud kemikaalide puhul (8) ja 70–110 % märgistamata kemikaalide puhul (3).

⁽¹⁾ Näiteks, kui katseaine sisaldab ühte rõngast, on nõutav see märgistada; kui katseaine sisaldab kahte või enamat rõngast, võib vaja minna eraldi uuringuid kummagi märgistatud rõnga säilimise hindamiseks ja sobiva teabe saamiseks transformatsioonisaaduste tekke kohta.

▼B**1.7.2. Analüüsimetodi korratavus ja tundlikkus**

Analüüsimetodi korratavust (v.a alguses tehtud ekstraheerimise tõhusus) katseaine ja transformatsiooni saaduste kvantifitseerimiseks saab kontrollida, korduanalüüsidest samast pinnasest tehtud ekstrakti, mida on inkubeeritud seni, kuni tekivad transformatsiooni-saadused.

Katseaine ja transformatsioonisaaduste puhul on analüüsimetodi avastamislävi (LOD) peaks olema vähemalt $0,01 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ mulla-proovi (katseainena) või 1 % kasutatud annusest, olenevalt sellest, kumb on väiksem. Kvantifikatsioonilävi (LOQ) tuleks samuti määrata.

1.7.3. Transformatsioonist saadud andmete täpsus

Katseaine kontsentratsioonide regressioonanalüüs ajafunktsioonina annab vajalikku teavet transformatsioonikõvera usaldusväärsuse kohta ning võimaldab arvutada pooldestruktiooni aegade usalduspiire (näilise esimese astme kineetika puhul) või DT_{50} väärtused ja vajaduse korral DT_{75} ja DT_{90} väärtused.

1.8. KATSEMETODI KIRJELDUS**1.8.1. Seadmed ja keemilised reaktiivid**

Inkubatsioonisüsteemid võivad olla staatiliselt suletud süsteemid või sobivad möödavoolusüsteemid (7, 17). Näited mullaproovide inkubatsioonil kasutatava möödavooluseadme ja Erlenmeyeri kolvi kohta on esitatud vastavalt joonistel 1 ja 2. Mõlemat tüüpi inkubatsioonisüsteemidel on eelised ja puudused (7, 17).

Nõutavad on standardsed laboriseadmed, eriti järgmised:

- analüütilised seadmed, näiteks GLC, HPLC, TLC-seadmed, kaasa arvatud radiomärgistatud või märgistamata ainete analüüsimisel kohaldatavad avastamissüsteemid või pööratud isotoopide lahjendusmeetod;
- identifitseerimisel kasutatavad seadmed (nt MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR jne);
- vedelikstsintillaatsioonloendur;
- oksüdeerija radioaktiivsete ainete põletamiseks;
- tsentrifuug;
- ekstraheerimisseade (nt tsentrifuugiküvetid külmeekstraheerimiseks ja Soxhlet' seade pidevekstraheerimiseks püstjahuti all);
- lahuste ja ekstraktide kontseentreerimise seadmed (nt pöördaurusti);
- veevann;
- mehaaniline segamisseade (nt sõtkumismasin, pöörlev segisti).

▼B

Kasutatud keemilised reaktiivid, näiteks:

- NaOH, analüütiliselt puhas, $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$, või muu sobiv alus (nt KOH, etanoolamiin);
- H^2SO^4 , analüütiliselt puhas, $0,05 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$;
- etüleenglükool, analüütiliselt puhas;
- tahked absorptsioonimaterjalid, nt naatronlubi ja polüüretaan-küünlad;
- orgaanilised lahustid, analüütiliselt puhtad, nt atsetoon, metaanool jt;
- stsintillatsioonvedelik.

1.8.2. **Katseaine annustamine**

Mullaproovi lisamiseks või levitamiseks võib katseainet lahustada vees (deioniseeritud või destilleeritud) või vajaduse korral väheses koguses atsetoonis või muudes orgaanilistes lahustites (6), milles katseaine on piisavalt lahustuv ja stabiilne. Valitud lahusti kogusel ei peaks siiski olema olulist mõju mulla mikroobsele aktiivsusele (vt punkte 1.5 ja 1.9.2–1.9.3). Selliste mikrobioloogilist aktiivsust inhibeerivate lahustite nagu kloroform, diklorometaan ja muud halogeenitud lahustid kasutamist tuleks vältida.

Katseainet võib samuti lisada tahkel kujul, nt segatud kvartsliiduga (6) või mullaproovide väikeste osaproovidena, mida on õhkuivatatud ja steriliseeritud. Kui katseainet lisatakse lahusti abil, tuleks lasta lahustil aurustuda enne katseainet sisaldava osaproovi lisamist algupärasesse ebasteriilsesse mullaproovi.

Üldkemikaalide puhul, mis sisenevad mulda üldiselt reoveesetete kaudu või põllumajanduslikul kasutamisel, tuleks katseainet esmalt lisada reovette, mida seejärel annustatakse mullaproovi (vt punkte 1.9.2 ja 1.9.3).

Preparaatide kasutamist tavaliselt ei soovitata. Nt nõrgalt lahustuva katseaine puhul võib siiski kasutada preparaati sobiva alternatiivina.

1.8.3. **Pinnased**

1.8.3.1. *Pinnase valik*

Transformatsioonitee kindlaksmääramisel võib kasutada representatiivset pinnast; soovitatav pinnasetüüp on saviliiv või liivsavi või savi või savine liiv (vastavalt FAO ja USDA klassifikatsioonile (18)), mille pH on 5,5–8,0, orgaanilise süsiniku sisaldus on of 0,5–2,5 % ja mikroobi biomass on vähemalt 1 % orgaanilise süsiniku koguhulgast (10).

Transformatsioonitee määramisel tuleks uurida vähemalt kolme representatiivset pinnast. Pinnaste orgaanilise süsiniku sisaldus, pH, savi sisaldus ja mikroobi biomass on erinevad (10).

▼B

Kõiki pinnaseid tuleks iseloomustada vähemalt nende tekstuuri (liiva, aluerüdi, savi (protsentides)) (vastavalt FAO ja USDA klassifikatsioonile (18)), pH, kationvahetusvõime, orgaanilise süsiniku, lasuvustiheduse, veeläbilaskvusvõime⁽¹⁾ ja mikroobi biomassi poolest (üksnes aeroobsetes uuringutes). Tulemuste tõlgendamisel võib osutada kasulikult lisateave pinnaseomaduste kohta. Pinnaseomaduste kindlaksmääramiseks saab kasutada viidetes (19, 20, 21, 22, 23) soovitatud meetodeid. Mikroobi biomass tuleks määrata substraadi indutseeritud hingamise (SIR) meetodi (25, 26) või alternatiivsete meetodite abil (20).

1.8.3.2. *Mullaproovide kogumine, käsitlemine ja säilitamine*

Üksikasjalik teave proovikogumiskoha ajaloo kohta peaks olema kättesaadav. Üksikasjade hulka kuuluvad täpne asukoht, taimkate, põllukultuuride kaitsevahenditega töötlemise kuupäevad, orgaaniliste ja anorgaaniliste väetistega töötlemine, bioloogiliste materjalide lisamine või juhuslik saastumine. Kui pinnaseid on juba töödeldud katseainega või selle struktuursete analoogidega viimase nelja aasta jooksul, ei tuleks neid kasutada transformatsiooni uuringutel (10, 15).

Muld peaks olema värskelt kogutud põllult (A-horisonidilt või üleemisest 20 cm kihist), ning selle veesisaldus peaks olema selline, et hõlbustaks sõelumist. Muude muldade kui riisipõldude muldade puhul tuleks vältida proovide võtmist pikkade (> 30 päeva) põua-, külmumis- või üleujutusperioodide jooksul või vahetult pärast neid (14). Proove tuleks transportida nii, et muutused mulla veesisalduses oleksid minimaalsed ja neid tuleks hoida pimedas võimalikult vaba õhujuurdepääsuga. Nõrgalt seotud polüetüleenkott on üldiselt selleks piisav.

Mulda tuleks töödelda nii ruttu kui võimalik pärast proovivõtmist. Taimed, suurem mullafauna ja kivid tuleks eemaldada enne mulla sõelumist läbi 2 mm sõela, mis eemaldab väikesed kivid, fauna ja taimejäämed. Tuleks vältida mulla ulatuslikku kuivatamist ja purustamist enne sõelumist (15).

Kui põllult proovide võtmine on raske talvel (pinna on külmunud või kaetud lumekihtidega), võib proove võtta mullapartiist, mida säilitatakse kasvuhoones taimkatte all (nt rohu või rohu-ristikheina segu all). Väga on eelistatud uuringud värskelt põllult kogutud muldadega, kuid kui kogutud ja töödeldud mulda tuleb säilitada enne uuringu algust, peavad säilitamistingimused olema piisavad ja üksnes piiratud aja jooksul (4 ± 2 °C maksimaalselt kolm kuud), et säiliks mikroobne aktiivsus⁽²⁾. Üksikasjalikud juhendid selliste mullaproovide kogumiseks, käsitlemiseks ja säilitamiseks, mida kasutatakse biotransformatsioonikatsetes, on toodud viidetes (8, 10, 15, 26, 27).

⁽¹⁾ Pinnase veeläbilaskvusvõimet saab mõõta väliveemahutavusena, veemahutavuse või imirõhuna (pF). Selgitused on liites 1. Katseprotokollis tuleks edastada, kas pinnase veeläbilaskvusvõime ja lasuvustihedus määrati kindlaks loodusparastes väliproovides või häiritud (töödeldud) proovides.

⁽²⁾ Viimased uurimistulemused viitavad sellele, et parasvöötmes kogutud mullaproove saab samuti säilitada -20 °C juures üle kolme kuu (28, 29) mikroobide aktiivsust oluliselt häirimata.

▼B

Enne töödeldud pinnase kasutamist katses, tuleks seda eelinkubeerida, et lasta seemnetel idaneda ja saaks need eemaldada ning taastada mikroobide ainevahetuse tasakaal pärast proovivõtu- ja säilitamistingimuste muutumist inkubatsioonitingimusteks. 2–28 päeva vahel toimuv eelinkubeerimine ligikaudu samadel temperatuuri ja niiskuse tingimustel nagu tegelikus katseski on üldiselt piisav (15). Säilitamis- ja eelinkubeerimisperiodid kokku ei tohiks ületada kolme kuud.

1.9. KATSE KÄIK

1.9.1. **Katsetingimused**1.9.1.1. *Katsetemperatuur*

Kogu katseperioodi jooksul tuleks mullaproovid inkubeerida pimedas konstantsel temperatuuril, mis vastab kliimatingimustele, kus katseainet kasutati või kus toimus vabastamine. Kõikide parasvöötmes pinnasesse jõudvate katseainete puhul on soovitatav temperatuur 20 ± 2 °C. Temperatuuri tuleks jälgida.

Kemikaalide puhul, mida kasutatakse või mis vabanevad külmemas kliimas (nt põhjamaades, sügis/talveperioodil), tuleks inkubeerida lisaproove, kuid madalamal temperatuuril (nt 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. *Niiskusesisaldus*

Aeroobsetes tingimustes transformatsioonikatsete puhul tuleks mulla niiskusesisaldust⁽¹⁾ reguleerida ja säilitada pF vahemikus 2,0–2,5 (3). Mulla niiskusesisaldust väljendatakse veemassina kuiva mulla massi kohta ja seda tuleks korrapäraselt kontrollida (nt kahepäevaste intervallide tagant), kaaludes inkubatsioonikolbe ja veekadusid, mida täiendatakse vee lisamise teel (eelistatavalt steriilne filtreeritud kraanivesi). Tuleks püüda vältida või vähendada katseaine ja/või transformatsioonisaaduste kadu lendumise ja/või fotolagundamise (kui see juhtub) kaudu vedeliku lisamise käigus.

Anaeroobsetes tingimustes transformatsioonikatsete käigus küllastatakse pinnast veega üleujutamise teel.

1.9.1.3. *Aeroobsed inkubatsioonitingimused*

Möödavoolumüsteemides säilitatakse aeroobsed tingimused vahelduva loputamise või pidevalt niisutatud õhuga ventileerimise teel. Erlenmeyeri kolbides tagatakse õhuvahetus difusiooni abil.

1.9.1.4. *Steriilsed aeroobsed tingimused*

Katseaine abiootilise transformatsiooni olulisuse kohta käiva teabe saamiseks võib mullaproovid steriliseerida (steriliseerimismeetodid on viidetes 16 ja 29), töödelda steriilse katseainega (nt lahuse lisamine läbi steriilse filtri) ja tuulutada niisutatud steriilse õhuga, nagu on kirjeldatud punktis 1.9.1.3. Riisipõldude mullaproovide puhul tuleks pinnast ja vett steriliseerida ja inkubeerida tuleks vastavalt punktile 1.9.1.6.

⁽¹⁾ Mullaproov ei tohiks kunagi olla liiga märg või liiga kuiv, et säiliks mulla mikrofloora piisav ohutus ja toitumine. Soovituslikud niiskusesisaldused optimaalseks mikroobi kasvuks on 40–60 % veemahutavusest (WHC) ja 0,1–0,33 baari (6). Viimane vahemik on sama, mis 2,0–2,5 pF-vahemik. Erinevatele mullatüüpidele omased niiskusesisaldused on toodud 2. liites.

▼ **B**1.9.1.5. *Aneroobsed inkubatsioonitingimused*

Anaeroobsete tingimuste loomiseks ja säilitamiseks katseainega töödeldud ja aeroobsetes tingimustes 30 päeva või ühe poolestusaja jooksul või DT_{50} ajal (olenevalt sellest, milleks kulub vähem aega) inkubeeritud pinnast küllastatakse seejärel veega (1–3 cm veekiht) ja inkubatsioonisüsteemi loputatakse inertse gaasiga (nt lämmastik või argoon) ⁽¹⁾. (2) Katsesüsteem peab võimaldama järgmiste mõõtmisi: pH, hapniku kontsentratsiooni ja redokspotentsiaali mõõtmised, ja sisaldama lenduvate saaduste püüdmise seadmeid. Erlenmeyeri kolbidest koosnev süsteem tuleb sulgeda, et vältida õhu sisenemist difusiooni teel.

1.9.1.6. *Niiske põllu mullaproovide inkubatsioonitingimused*

Riisipõllu mullaproovide transformatsiooni uurimisel ujutatakse pinnas üle ligikaudu 1–5 cm veekihiga ja katseainet annustatakse veefaasi (9). Soovitav pinnasesügavus on vähemalt 5 cm. Süsteemi õhutatakse samamoodi nagu aeroobsetel tingimustel. Veekihi pH, hapniku kontsentratsiooni ja redokspotentsiaali tuleks jälgida ja sellest teatada. Vähemalt kahepäevane eelinkubatsiooniperiood on vajalik enne transformatsiooniuringutega alustamist (vt punkt 1.8.3.2).

1.9.1.7. *Katse kestus*

Kiirust ja transformatsiooniteed käsitlevad uuringud ei tohiks tavaliselt ületada 120 päeva ⁽²⁾ (3, 6, 8), kuna seejärel eeldatakse, et väheneb mulla mikroobne aktiivsus tehislaborisüsteemis, kus ei täiene looduslikult toitainetavarad. Kui katseaine vähenemist ja peamiste transformatsioonisaaduste teket ja vähenemist on vaja kirjeldada, tuleks uuringuid jätkata pikema aja jooksul (nt 6 või 12 kuud) (8). Pikemaid inkubatsiooniperioode tuleks põhjendada katseprotokollis ja sellele tuleks lisada biomassi mõõtmised nimetatud perioodide kestel ja lõpus.

1.9.2. **Katse käik**

Ligikaudu 50–200 g mulda (kuivmassina) asetatakse iga inkubatsioonikolvi põhja (vt 3. liites jooniseid 1 ja 2) ning mulda töödeldakse katseainega ühe punktis 1.8.2 kirjeldatud meetodi abil. Kui orgaanilisi lahusteid kasutatakse katseaine annustamiseks, tuleks need eemaldada mullast aurustamise teel. Seejärel segatakse muld hoolikalt spaatliga ja/või kolvi raputamise teel. Kui uuring tehakse niiskete põldude tingimustes, tuleks mulda ja vett hoolikalt segada pärast katseaine lisamist. Väikeseid töödeldud muldade alikvoote (nt 1 g) tuleks analüüsida katseaine ühtlase jaotuse kontrollimiseks. Alternatiivne meetod on toodud allpool.

⁽¹⁾ Aeroobsed tingimused domineerivad pindmises mullakihis ja isegi aluspõhjas, nagu on näidatud ELi rahastatud uurimisprojekti (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). Anaeroobsed tingimused võivad esineda vaid juhuslikult pinnaste üleujutuste käigus pärast tugevaid sademeid või siis, kui on loodud niiske põllumajanduse tingimused riisipõldudel.

⁽²⁾ Aeroobsed uuringud tuleks lõpetada palju varem kui 120 päeva, tingimused et selgelt on selleks ajaks jõutud lõpliku transformatsiooniteeni ja lõpliku mineralisatsioonini. Katse lõpetamine on võimalik pärast 120 päeva või siis, kui vähemalt 90 % katseainest transformeeritakse, kuid tekkis ainult 5 % CO₂.

▼B

Annustatav kogus peaks vastama põllukultuuride kaitsevahendite kasutusjuhendites soovitatud suurimale annusele ja ühtset levimist sobivasse sügavusse (nt ülemisse 10 cm mullakihti ⁽¹⁾). Näiteks, kemikaalide puhul, mis levivad taimede lehtedesse või pinnasesse ilma, et need tungiksid taimedesse, sobiv sügavus selle arvutamiseks, kui palju kemikaali tuleks igasse kolbi lisada, on 2,5 cm. Pinnasesse tunginud kemikaalide puhul on sobiv sügavus kasutusjuhendis täpsustatud tungimissügavus. Üldkemikaalide puhul tuleks hinnata annustamist kõige sobivama pinnasesse tungimise tee põhjal, näiteks, kui peamine pinnasesse tungimise tee on läbi reoveesetete, tuleks kemikaali annustada reovette kontsentratsioonile, mis vastab oodatud reovee kontsentratsioonile, ja pinnasesse lisatud reovee hulk peaks vastama tavalisele põllumajanduses kasutatavate pinnaste reovee määrale. Kui see kontsentratsioon ei ole piisavalt suur peamiste transformatsioonisaaduste identifitseerimiseks, võib olla abiks erinevate suuremaid kontsentratsioone sisaldavate mullaproovide inkubeerimine, kuid tuleks vältida liiga suuri annusmäärasid, mis võivad mõjutada mulla mikroobide funktsioone (vt punkte 1.5 ja 1.8.2).

Alternatiivselt saab katseainega töödelda suuremat mullakogust (s.t 1–2 kg), seda hoolikalt segades sobiva segamisseadme abil ja seejärel asetades need väikeste, 50–200 g osadena inkubatsioonikolbidesse (nt proovijaoturite abil) Väikeseid töödeldud muldade alikvoote (nt 1 g) tuleks analüüsida katseaine ühtlase jaotuse kontrollimiseks. Sellist protseduuri eelistatakse, kuna see võimaldab ühtlasemalt katseainet pinnasesse jagada.

Samuti inkubeeritakse töötlemata mullaproove samadel tingimustel (aeroobsed) nagu katseainega töödeldud proove. Nimetatud proove kasutatakse biomassi mõõtmistel uuringu käigus ja lõpus.

Kui katseainet lisatakse pinnasesse lahjendatuna orgaanilis(t)es lahusti(te)s, inkubeeritakse sama koguse lahusti(te)ga töödeldud mullaproove samadel tingimustel (aeroobsed) kui katseainega töödeldud mullaproove. Nimetatud proove kasutatakse biomassi mõõtmistel uuringute alguses, kestel ja lõpus lahusti(te) mõjude kontrollimiseks mikroobi biomassi suhtes.

Töödeldud mullaproove sisaldavad kolvid kas kinnitatakse mööda-voolustusüsteemi, mida on kirjeldatud joonisel 1, või suletakse absorptsioonikoloni, mis on toodud joonisel 2 (vt 3. liidet).

(1) Järgmise võrrandi abil arvutatakse lähtekontsentratsioon pindala põhjal:

$$C_{\text{soil}} [\text{mg}/\text{kg}_{\text{soil}}] = \frac{A [\text{kg}/\text{ha}] \cdot 10^6 [\text{mg}/\text{kg}]}{l [\text{m}] \cdot 10^4 [\text{m}^2/\text{ha}] \cdot d [\text{kg}_{\text{soil}}/\text{m}^3]}$$

C_{soil} = lähtekontsentratsioon mullaproovis [$\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$]

A = annustamine [$\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$]; l = mullakihi paksus uuritavas keskkonnas [m]; d = kuivlasuvustihedus [$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$].

Resikareegel on, et annustamisel 1 $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ saadakse pinnase kontsentratsiooniks kigikaudu 1 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ kihis (oletades, et lasuvustihedus on 1 $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

▼B**1.9.3. Proovide võtmine ja mõõtmine**

Paralleelsed inkubatsioonikolvid eemaldatakse sobiva ajavahemiku tagant ja mullaproovid ekstraheeritakse erineva polaarsusega lahustitega ning analüüsitakse katseaine ja/või transformatsioonisaaduste osas. Hästi väljatöötatud uuringus on piisavalt kolbe, et igal proovivõtukorral kasutatakse kahte kolbi. Samamoodi eemaldatakse absorptsioonilahused või tahked absorptsioonimaterjalid erinevate ajavahemike tagant (seitsmepäevane intervallid esimese kuu jooksul ja pärast ühe kuu möödumist 17päevased intervallid) iga mullaproovi inkubatsiooni kestel ja lõpus ning analüüsitakse lenduvate saaduste osas. Kohe katseaine manustamise järel (0-päeva proov) võetud mullaproovile lisaks tuleks katsetesse lisada vähemalt viis erinevat proovivõtukohta. Ajavahemikud tuleks valida nii, et katseaine vähenemisaegu ning transformatsioonisaaduste tekke- ja vähenemisaegu saaks määrata (nt 0, 1, 3, 7 päeva; 2, 3 nädalat; 1, 2, 3 kuud jne).

Kasutades ¹⁴C-märgistusega katseainet, ekstraheerimata radioaktiivsete ainete määr määratakse põlemise teel ja ainetase arvutatakse iga proovivõtuoja kohta.

Anaeroobsete ja niiske põllu proovide korral mulla- ja veefaase ning katseaine ja transformatsioonisaaduseid analüüsitakse või eraldatakse filtreerimise või tsentrifuugimise teel enne ekstraheerimist ja analüüsi.

1.9.4. Valikkatsed

Aeroobsetes, mitteteriilsetes uuringutes, milles kasutatakse muid temperatuure ja mullaniiskust, võib hinnata pinnase temperatuuri ja niiskuse mõju katseaine ja/või selle transformatsioonisaaduste transformatsioonikiirust pinnases.

Ekstraheerimata radioaktiivseid aineid võib lisaks proovida kirjeldada näiteks ülikriitilisel vedeliku ekstraheerimisel.

2. ANDMED**2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Katseaine, transformatsioonisaaduste, lenduvate ainete (vaid protsendina) ja ekstraheerimata ainete kogused tuleks esitada protsendina lähtekontsentratsioonist ja vajaduse korral $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ mullaproove (tahke kuivmass) igas proovivõtvahemikus. Ainetase tuleks esitada protsendina lisatud lähtekontsentratsioonist igas proovivõtvahemikus. Katseaine graafiline esitamine aja funktsioonina aitab hinnata transformatsiooni poolestusaega või DT_{50} . Peamised transformatsioonisaadused tuleks identifitseerida ja nende kontsentratsioonid tuleks esitada aja funktsioonina, et näidata nende tekke- ja vähenemiskiirust. Peamised transformatsioonisaadused on mis tahes saadused, mida esineb igal ajahetkel uuringu käigus ≥ 10 % katseaine annusest.

Kinnipüütud lenduvad ained annavad märke selle kohta, et katseaine ja selle transformatsioonisaaduste võimest pinnasest lenduda.

▼B

Sobivate kineetilise mudeli kohaste arvutuste põhjal peaks saama täpsemalt määrata poolestusajad või DT_{50} väärtused ja vajaduse korral DT_{75} ja DT_{90} väärtused. Poolestusajad ja DT_{50} väärtused tuleks teatada koos kasutatava mudeli, kineetika astme ja määramiskoeffitsiendi (r^2) kirjeldusega. Esimese astme kineetika on soositud, välja arvatud juhul, kui $r^2 < 0,7$. Vajaduse korral tuleks arvutused teha peamiste transformatsioonisaaduste kohta. Sobivate mudelite näiteid kirjeldatakse viidetes 31–35.

Uurides erinevatel temperatuuridel kiiruseid, tuleks kirjeldada transformatsioonikiirust temperatuuri funktsioonina katsetemperatuuri vahemikus, kasutades Arrheniuse võrrandit kujul:

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = \ln A - \frac{B}{T}$$

kus $\ln A$ ja B on kõige sobivama joone lõikepunktist ja tõusust saadavad regressioonkonstandid, mis saadakse $\ln k$ ja $1/T$ lineaarse regressioonanalüüsi tulemusena, k on kiirusekonstant temperatuuril T ja T on temperatuur Kelvini järgi. Kui transformatsiooni reguleerib mikroobide tegevus, tuleks võtta arvesse piiratud temperatuurivahemikku, milles Arrheniuse võrrand kehtib.

2.2. TULEMUSTE HINDAMINE JA TÕLGENDAMINE

Kuigi uuringuid tehakse tehislaboritingimustes, saab tulemuste põhjal hinnata katseaine transformatsioonikiirust ja samuti transformatsioonisaaduste tekke- ja vähenemiskiirust välitingimustes (36, 37).

Katseaine transformatsioonitee uuring annab teavet selle kohta, kuidas lisatud ainet struktuur pinnases muutub keemiliste ja mikroobsete reaktsioonide abil.

3. ARUANDLUS

3.1. KATSEARUANNE

Katsearuanne peab sisaldama järgmist teavet.

Katseaine:

- üldnimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem (tuues ära märgi/märkide asukohta, kui kasutatakse radiomärgistatud ainet) ja asjaomased füüsikalise-keemilised omadused (vt punkti 1.5);
- katseaine puhtus (lisandid);
- märgistatud kemikaali radiokeemiline puhtus ja spetsiifiline aktiivsus (vajaduse korral).

Võrdlusained:

- selliste võrdlusainete keemiline nimetus ja struktuur, mida kasutatakse transformatsioonisaaduste kirjeldamiseks ja/või identifitseerimiseks.

Katsepinnased:

- üksikasjalikud andmed kogumiskoha kohta;
- mullaproovide võtmise kuupäev ja protseduur;

▼B

— pinnase omadused, nt pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, tekstuur (liiva-, aleuriidi-, saviprotsent), kationvahetusvõime, lasuvustihedus, veeläbilaskvusvõime ja mikroobi biomass;

— mullaproovide säilitamise kestus ja tingimused (kui need säilitatakse).

Katsetingimused:

— uuringute tegemise kuupäevad;

— lisatud katseaine kogus;

— kasutatud lahustid ja katseaine lisamise meetod;

— töödeldud mullaproovide lätemass ja nende mass analüüsi igal proovivõtukorral;

— kasutatud inkubatsioonisüsteemi kirjeldus;

— õhu voolukiirus (üksnes möödavoolussüsteemides);

— katsesüsteemi temperatuur;

— mullaproovide niiskusesisaldus inkubatsiooni ajal;

— mikroobi biomass aeroobse uuringu alguses, kestel ja lõpus;

— pH, hapniku kontsentratsioon ja redokspotentsiaal anaeroobsete ja niiske põllumaa uuringute alguses, kestel ja lõpus;

— ekstraheerimismeetod;

— katseaine ja peamiste transformatsioonisaaduste kvantifitseerimis- ja identifitseerimismeetodid mullaproovides ning ja absorptsioonimaterjalides;

— paralleelproovide arv ja kontrollproovide arv.

Tulemused:

— mikroobide tegevuse määramistulemus;

— kasutatud analüüsimeetodite korratavus ja tundlikkus;

— saagisemäärad (valiidse katse protsendimäärad on toodud punktis 1.7.1);

— tulemused tabeli kujul, väljendatuna protsendina lähteannusest ja vajaduse korral $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ mullaproovi (kuivmass);

— ainetase uuringute kestel ja lõpus;

— pinnase ekstraheerimata (seotud) radioaktiivsuse või jääkide iseloomustamine;

— vabanenud CO_2 ja muude lenduvate ühendite kvantifitseerimine;

— katseaine ja vajaduse korral transformatsioonisaaduste kontsentratsioonid mullaproovis esitatud aja funktsioonina;

— katseaine ja vajaduse korral transformatsioonisaaduste poolestusaeg või DT_{50} , DT_{75} ja DT_{90} väärtused usaldusvahemikes;

▼B

- hinnang abiootilise lagunemise kiirusele steriilsetes tingimustes;
- hinnang katseaine ja vajaduse korral peamiste transformatsiooni-saaduste transformatsioonikineetika kohta;
- vajaduse korral eeldatavad transformatsiooniteed;
- tulemuste arutelu ja tõlgendamine;
- töötlemata tulemused (s.t proovide kromatogrammide, transformatsioonikiirust käsitlevate arvutused ja transformatsioonisaaduste identifitseerimiseks kasutatavad vahendid).

4. **VIITED**

- 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) European Union (EU) (1995). Commission Directive 95/36/EC of 14 July 1995 amending Council Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. Annex II, Part A and Annex III, Part A: Fate and Behaviour in the Environment.
- 4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- 5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4-1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- 6) ISO/DIS 11266-1 (1994). Soil Quality – Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1: Aerobic conditions.
- 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 (199 3). 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) Annex V to Dir. 67/548/EEC.
- 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*, 3 3, 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. Keelney, 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) Muckenhausen, 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 bio-transformation of pesticides in aqueous environment. *Proceedings of the 16 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., Sjudahl-Svensson K., Stenstrom 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 Fesdegung 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

1. liide

VEEPINEVUS, VÄLIVEEMAHUTAVUS (FC) JA VEEMAHUTAVUS (WHC) ⁽¹⁾

Veesamba kõrgus (cm)	pF ^(a)	baar ^(b)	Märkused
10 ⁷	7	10 ⁴	Kuiv pinnas
1,6 · 10 ⁴	4,2	16	Närbumispiir
10 ⁴	4	10	
10 ³	3	1	
6 · 10 ²	2,8	0,6	
3,3 · 10 ²	2,5	0,33 ^(c)	Väliveemahutavuse ala ^(d)
10 ²	2	0,1	
60	1,8	0,06	
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	WHC (hinnang)
1	0	0,001	Veega küllastatud pinnas

^(a) pF = veesamba kõrguse (cm) logaritm.

^(b) 1 baari = 10⁵ Pa.

^(c) Vastab ligikaudsele 10 %lisele veesisaldusele liivas, 35 %lisele mudas ja 45 %lisele savis.

^(d) Väliveemahutavus ei ole konstantne, vaid see varieerub vastavalt mulla tüübile pF 1,5 ja 2,5 vahel.

Veepinevust mõõdetakse veesamba kõrgusena (cm) või baarides. Imirõhu laia ulatuse tõttu väljendatakse seda üksnes pF väärtusena, mis vastab veesamba logaritmile.

Väliveemahutavus on määratletud veehulgana, mida võib säilitada atmosfäärirõhus looduspinnases 2 päeva pärast pikemat vihmaperioodi või pärast piisavat kastmist. See määratakse looduspäras pinnases *in situ* põllul. Mõõtmist seega ei kohaldata pinnase häiritud laboriproovides. Häiritud mullaproovides määratud FC väärtused võivad esindada suuri süsteemseid muutusi.

Veemahutavus (WHC) määratakse kindlaks laboris looduspäras või häiritud mullas, küllastades mullasammast veega kapillaartranspordi teel. See on eriti kasulik häiritud mullaproovide teel ja võib olla kuni 30 % suurem kui väliveemahutavus ⁽¹⁾. Samuti võib olla seda katseliselt kergem määrata kui usaldusväärseid FC-väärtusi.

Märkused

⁽¹⁾ Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

▼B

2. liide

**ERINEVATEST RIIKIDEST ERINEVATEST MULLATÜÜPIDEST VÕETUD
MULLAPROOVIDE NIISKUSESISALDUS (g vett 100 g kuiva pinnase kohta)**

Mullatüüp	Riik	Niiskusesisaldus		
		WHC ⁽¹⁾	pF = 1,8	pF = 2,5
Liiv	Saksamaa	28,7	8,8	3,9
Mudane liiv	Saksamaa	50,4	17,9	12,1
Mudane liiv	Šveits	44,0	35,3	9,2
Aleuriitne muda	Šveits	72,8	56,6	28,4
Savimuda	Brasilia	69,7	38,4	27,3
Savimuda	Jaapan	74,4	57,8	31,4
Liivane muda	Jaapan	82,4	59,2	36,0
Aleuriitne muda	Ameerika Ühendriigid	47,2	33,2	18,8
Liivane muda	Ameerika Ühendriigid	40,4	25,2	13,3

⁽¹⁾ Veemahutavus.

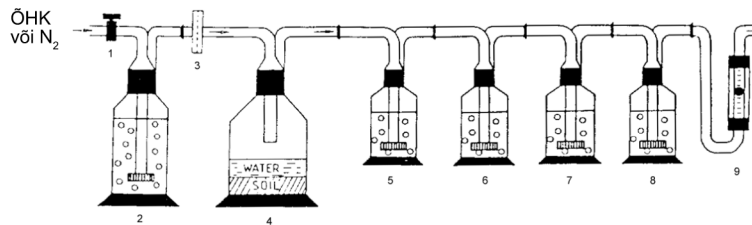
▼ **B**

3. liide

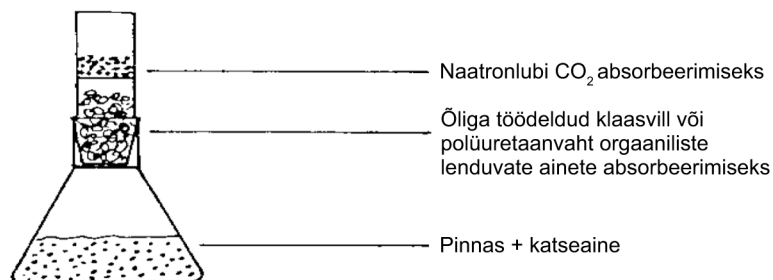
Joonis 1

Näide möödavooluseadme, mida kasutatakse kemikaalide transformatsiooni uurimisel pinnases ⁽¹⁾ ⁽²⁾

- | | | |
|--|--|--|
| 1: nõelventiil | 4: pinnase ainevahetuse kolb (veega küllastatud üksnes anaeroobsetes ja niiske põllumaa tingimustes) | 7, 8: naatriumhüdroksiidilõks CO ₂ ja muude happeliste lenduvate ainete jaoks |
| 2: vett sisaldavad gaasipesupudelid | 5: etüleenglükoolilõks orgaaniliste lenduvate ühendite jaoks | 9: voolumõõtur. |
| 3: ultramembraan (üksnes steriilsed tingimused), poori suurus 0.2 µm | 6: väävelhappelõks leeliseliste lenduvate ühendite jaoks | |



Joonis 2

Näide Erlenmeyeri kolvist, mida kasutatakse kemikaalide transformatsiooni uurimisel pinnases ⁽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 Diallylat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141-146.

▼B**C.24. AEROOBNE JA ANAEROOBNE TRANSFORMATSIOON PÕHJASETTES****1. MEETOD**

Käesolev meetod lähtub juhendist OECD TG 308 (2002).

1.1. SISSEJUHATUS

Kemikaalid võivad pääseda madalasse või sügavasse pinnavette näiteks otse annustatuna, õhku pihustatuna, äravoolu või kuivendamise kaudu, jäätmete kõrvaldamisel, tööstusliku, kodumajapidamise või põllumajandusliku heitveena ja atmosfäärist väljasadenemisel. Käesolev katsemeetod kirjeldab laborimeetodit, mida kasutatakse orgaaniliste kemikaalide aeroobse ja anaeroobse transformatsiooni hindamiseks põhjasettes. See põhineb olemasolevatel juhenditel (1, 2, 3, 4, 5, 6). Käesolevas katses kasutatavate pinnaste arvu ja tüüpide osas lepitati kokku pinnase ja sedimentide valikut käsitlevas OECD tööühmas, mis tuli kokku Belgirates Itaalias 1995. aastal (7). Tööühm tegi samuti soovitusi seoses mullaproovide kogumise, käsitlemise ja säilitamisega, vastavalt ISO juhendile (8). Sellised uuringud tehakse kemikaalidega, mida levitatakse otse vette või mis tõenäoliselt jõuavad veekeskkonda eespool kirjeldatud viisil.

Loodusliku põhjasette tingimused on tihti aeroobsed ülemises veefaasis. Sette pinnakiht võib olla kas aeroobne või anaeroobne, kuigi sügavam sete on tavaliselt anaeroobne. Kõikide nende võimaluste hõlmamiseks kirjeldatakse käesolevas dokumendis nii aeroobseid kui ka anaeroobseid katseid. Aeroobne katse simuleerib aeroobset veesammast, mille all on aeroobne settekiht ja mille all omakorda anaeroobne gradient. Anaeroobne katse simuleerib täielikult anaeroobset põhjasetet. Kui asjaolud viitavad sellele, et on vaja oluliselt kõrvale kalduda neist soovitustest, nt kasutades puutumata sette tuuma või setteid, mis võivad olla kokku puutunud katseainetega, on selleks kättesaadavad muud meetodid (9).

1.2. MÕISTED

SI-ühikuid tuleks kasutada igal juhul.

Katseaine – mis tahes aine, kas lähteühend või vastav transformatsioonisaadus.

Transformatsioonisaadused – kõik katseaine biotilistes või abiootilistes transformatsioonireaktsioonides saadud ained, kaasa arvatud CO₂ ja tooted, mis on seotud jääkides.

Seotud jäägid – pinnases, taimedes või loomades olevad ühendid, mis ekstraheerimise järel säilivad matriitsis lähteainena või selle metaboliidi (metaboliitide)/transformatsioonisaadustena. Ekstraheerimismeetod ei tohiks oluliselt muuta ühendit ennast või matriitsi struktuuri. Seose olemust saab selgitada osaliselt matriitsi muutva ekstraheerimismeetodi ja täiustatud analüüsitehnikate abil. Täna seni, näiteks, on sel viisil kindlaks tehtud kovalentsed ioonsidemed ja sorptsioonsidemed ning „lõksud”. Üldiselt vähendab seotud jääkide teke oluliselt bioloogilist kättesaadavust ja bioloogilist omastatavust (10) (1984. aasta IUPACi muudatus (11)).

▼B

Aeroobne transformatsioon – (oksüdeeriv): reaktsioonid, milles osaleb molekulaarne hapnik (12).

Anaeroobne transformatsioon – (reduktseeriv): reaktsioonid, milles ei osale molekulaarne hapnik (12).

Looduslikud veed – pinnaveed, mis on saadud tiikides, jõgedes, ojades jm.

Sete – segu mineraalsetest ja orgaanilistest keemilistest koostisainetest, millest viimased sisaldavad kõrge süsiniku- ja lämmastikusisaldusega ning suure molekulmassiga ühendeid. See sadestub looduslikku vette, millega ta moodustab piirkihi.

Mineralisatsioon – orgaanilise ühendi täielik lagunemine CO₂-ks ja H₂O-ks aeroobsetes tingimustes ning CH₄-ks, CO₂-ks ja H₂O-ks anaeroobsetes tingimustes. Käesoleva katsemeetodi kontekstis, kui kasutatakse radiomärgistatud ühendit, tähendab mineralisatsioon ulatuslikku lagundamist, mille käigus märgistatud süsinikuaatom oksüdeeritakse ning vabaneb sobiv kogus ¹⁴CO₂ või ¹⁴CH₄.

Poolestusaeg, t_{0,5} – aeg, mis kulub katseaine 50 %liseks transformatsiooniks, kui transformatsiooni saab kirjeldada esimese astme kineetika abil; poolestusaeg ei sõltu lähtekontsentratsioonist.

DT₅₀ (hävimisaeg 50) – aeg, mille jooksul katseaine lähtekontsentratsiooni vähendatakse 50 % võrra.

DT₇₅ (hävimisaeg 75) – aeg, mille jooksul katseaine lähtekontsentratsiooni vähendatakse 75 % võrra.

DT₉₀ (hävimisaeg 90) – aeg, mille jooksul katseaine lähtekontsentratsiooni vähendatakse 90 % võrra.

1.3. VÕRDLUSAINED

Võrdlusaineid tuleks kasutada transformatsioonisaaduste identifitseerimiseks ja/või kvantifitseerimiseks spektroskoopiliste ja kromatograafiliste meetodite abil.

1.4. TEAVE KATSEAINE KOHTA

Märgistamata või isotoopmärgistatud katseainet saab kasutada transformatsioonikiiruse mõõtmiseks, kuigi eelistatakse märgistatud materjali. Märgistatud materjal on nõutav transformatsioonitee uurimiseks ja ainetaseme määramiseks. ¹⁴C-märgistust soovitatakse, kuid muude isotoopide (näiteks ¹³C, ¹⁵N, ³H, ³²P) kasutamine võib olla samuti kasulik. Niipalju kui võimalik tuleks märgistus asetada molekuli kõige stabiilsema(te) osa(de) külge (¹). Katseaine keemiline ja/või radiokeemiline puhtus peaks olema vähemalt 95 %.

Enne katse sooritamist peaks katseaine kohta olema olemas järgmine teave:

- a) lahustuvus vees (meetod A.6);
- b) lahustuvus orgaanilistes lahustites;
- c) aururõhk (meetod A.4) ja Henry konstant;

(¹) Näiteks, kui aine sisaldab ühte rõngast, tuleb see rõngas märgistada. Kui katseaine sisaldab kahte või enam rõngast, on vaja eraldi katseid teha, et hinnata iga märgistatud rõnga säilimise hindamiseks ning sobiva teabe saamiseks transformatsioonisaaduste tekke kohta.

▼B

- d) n-oktanolii/vee jaotustegur (meetod A.8);
- e) adsorptsioonikoefitsient (K_d , K_f või K_{oc} vajaduse korral) (meetod C.18);
- f) hüdrolüüs (meetod C.7);
- g) dissotsiatsioonikonstant (pK_a) (OECD juhend 112) (13);
- h) katseaine keemiline struktuur ja isotoopmargistus(t)e asukoht, kui need esinevad.

Märkus. Tuleks märkida temperatuur, mille juures mõõtmisi tehakse.

Muu kasuliku teabe hulka võivad kuuluda andmed katseaine mikroorganismidele mõjuva mürgisuse kohta, andmed kiire ja/või inherentse biolagundatavuse kohta ning andmed aeroobse ja anaeroobse transformatsiooni kohta pinnases.

Katseaine ja selle vees ja settes olevate transformatsioonisaaduste kvantifitseerimise ja identifitseerimise analüüsimeetodid (sh ekstraheerimis- ja puhastamismeetodid) peaksid olema kättesaadavad (vt punkti 1.7.2).

1.5. KATSEMEETODI PÕHIMÕTE

Käesolevas katses kirjeldatud meetod kasutab aeroobseid ja anaeroobseid põhjaseteid (vt 1. liidet), mis võimaldavad:

- i) katseaine transformatsioonikiiruse mõõtmist põhjasettes;
- ii) katseaine transformatsioonikiiruse mõõtmist settes;
- iii) katseaine ja/või transformatsioonisaaduste mineralisatsioonikiiruse mõõtmist (kui kasutatakse ^{14}C -märgistusega katseainet);
- iv) transformatsioonisaaduste identifitseerimine ja kvantifitseerimine vee- ja settefaasides, sh ainetase (kui kasutatakse märgistatud katseainet);
- v) katseaine ja selle transformatsioonisaaduste jaotamise mõõtmine kahe faasi vahel inkubatsiooni ajal pimedas (et vältida, näiteks, vetikavohangut) konstantsel temperatuuril. Poolestusajad, DT_{50} , DT_{75} ja DT_{90} väärtused määratakse, kui andmed seda lubavad, kuid neid ei tohiks ekstrapoleerida pikalt üle katseperioodi (vt punkti 1.2).

Vähemalt kaks setet ja nendega seotud veed on nõutavad nii aeroobseks kui anaeroobseks katseks (7). Siiski võib esineda olukordi, kui tuleks kasutada rohkem kui kahte põhjasetet, näiteks, kemikaalide puhul, mis võivad esineda magevees ja/või merekeskkonnas.

▼B

1.6. KATSE KOHALDAMISALA

Meetodid kohaldatakse kõikide keemiliste ainete suhtes (mürgistamata või mürgistatud, mille kohta on olemas piisavalt täpne ja tundlik analüüsimeetod. See on kohaldatav kergelt lenduvate, mitte-lenduvate, veeslahustuvate või vees halvasti lahustuvate ühendite suhtes. Katset ei kohaldata kemikaalide suhtes, mis kergesti lenduvad pinnasest (nt fumigandid, orgaanilised lahustid) ja seega ei saa seda hoida vees ja/või settes käesolevates katsemeetodites.

Meetodid on kohaldatud nii palju, et uurida kemikaalide transformatsiooni magevees ja setetes, kuid põhimõtteliselt võib seda kohaldada ka suudmealas ja merekeskkonnas. See ei sobi voolava vee (nt jõed) või avamere tingimuste simuleerimiseks.

1.7. KVALITEEDIKRITERIUMID

1.7.1. Saagis

Vähemalt kahe vee- ja setteproovi ekstraheerimine ja analüüs kohe katseaine lisamise järel annab esimesi märke analüüsimeetodi korratavuse kohta ning katseaine manustamise ühtsuse kohta. Saagised katse hilisematelt etappidelt on saadud vastavatelt ainetasemetelt (kui kasutatakse mürgistatud materjali). Saagised peaksid jääma vahemikku 90–110 % mürgistatud kemikaalide puhul (6) ja 70–110 % mürgistamata kemikaalide puhul.

1.7.2. Analüüsimeetodi korratavus ja tundlikkus

Analüüsimeetodi korratavust (v.a alguses tehtud ekstraheerimise tõhusus) katseaine ja transformatsiooni saaduste kvantifitseerimiseks saab kontrollida, korduval analüüsis samast veest või settest tehtud ekstrakti, mida on inkubeeritud seni, kuni tekivad transformatsiooni-saadused.

Katseaine ja transformatsioonisaaduste puhul peaks analüüsimeetodi avastamislävi (LOD) olema vähemalt $0,01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ vee- või setteproovina (katseainena) või 1 % kasutatud lähteannusest, olenevalt sellest, kumb on väiksem. Kvantifikatsioonilävi (LOQ) tuleks samuti määrata.

1.7.3. Transformatsioonist saadud andmete täpsus

Katseaine kontsentratsioonide regressioonanalüüs ajafunktsioonina annab vajalikku teavet transformatsioonikõvera täpsuse kohta ning võimaldab arvutada poolestusaegade usalduspiire (näilise esimese astme kineetika puhul) või DT_{50} väärtused ja vajaduse korral DT_{75} ja DT_{90} väärtused.

1.8. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.8.1. Katsesüsteem ja -seadmed

Katse tuleks teha klaasmahutites (nt pudelid, tsentrifuugiküvetid), välja arvatud juhul, kui esialgne teave (nt (n-oktanooli-vee jaotustegur, sorptsiooniandmed jne) viitab sellele, et katseaine võib kinnituda klaasile, mistõttu võiks kaaluda alternatiivse materjali kasutamist (nt Teflon®). Kui on teada, et katseaine kinnitub klaasile, võib olla võimalik leevendada seda probleemi, kasutades ühte või mitut järgmistest meetoditest:

▼B

- määrata klaasile kinnitunud katseaine ja transformatsioonisaaduste mass;
- pesta kõik klaasnõud lahustiga katse lõpus;
- kasutada preparaate (vt ka punkti 1.9.2);
- kasutada katseaine süsteemi lisamisel kaaslahusti suurenenud kogust; kui kasutatakse kaaslahustit, peaks see olema selline, mis ei solvolüüsi katseainet.

Tüüpilise katseeadme näited, s.t gaasimöödavoolu- ja biomeetersüsteemid, on toodud vastavalt 2. ja 3. liites (14). Muid kasulikke inkubatsioonisüsteeme on kirjeldatud viites 15. Katseeadme ülesehitus peaks olema selline, et see võimaldab õhu või lämmastiku vahetust ning lenduvate ainete püüdmist. Seadme mõõdud peaksid vastama katsetingimustele (vt 1.9.1). Ventilatsioon tagatakse kas kerge mullitamise või viies õhu või lämmastiku veepinnale. Viimasel juhul on soovitatav segada vett kergelt ülevalpool, et hapnik või lämmastik vees paremini leviks. CO₂-vaba õhku ei tohiks kasutada, kuna see võib põhjustada vee pH taseme tõusu. Igal juhul sette häirimine on ebasoovitatav ja seda peaks vältima niipalju kui võimalik. Kergelt lenduvaid aineid tuleks uurida biomeetersüsteemis, veepinda kergelt segades. Samuti võib kasutada suletud anumaid, milles on kas atmosfääriõhuga või lämmastikuga õhuruum, ja sisemisi pudeleid lenduvate ainete püüdmiseks (16). Õhuruumi gaasi regulaarne vahetumine on nõutav aeroobses katses, et kompenseerida hapniku tarbimist biomassi poolt.

Lenduvate transformatsioonisaaduste kogumiseks sobivad lõksud sisaldavad, kuid mitte ainult 1 mol·dm⁻³ kaaliumhüdroksiidi või naatriumhüdroksiidi lahuseid süsinikdioksiidi puhul⁽¹⁾ ja etüleenglükooli, etanoolamiini või 2 % parafiini ksüleenis orgaaniliste ühendite puhul. Anaeroobsetes tingimustes tekkinud lenduvad ained, näiteks metaan, saab koguda, näiteks, molekulaarsõelade abil. Sellised lenduvad ained saab põletada, näiteks, CO₂-ks, viies gaasi CuO-ga täidetud kvartstorusse temperatuuril 900 °C ja püüdes absorberis tekkinud CO₂ leelisesse (17).

Nõutavad on katseainete ja transformatsioonisaaduste keemilise analüüsi laboriseadmed (nt gaasvedelikkromatograafia (GLC), kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC), planaarkromatograafia (TLC), mass-spektroskoopia (MS), gaaskromatograafia – mass-spektroskoopia (GS-MS), vedelikkromatograafia – mass-spektromeetria (LC-MS), tuumamagnetresonants (NMR) jne), sh vajaduse korral radiomärgistatud või märgistamata kemikaalide avastamissüsteemid. Kui kasutatakse radiomärgistatud materjali, soovitatakse samuti vedelikstsintillatsioonloendurit ja oksüdeerijat põletamiseks (setteproovide põletamiseks enne radioaktiivsuse analüüsi).

Muud standardlaboriseadmed füüsikalise-keemiliste ja bioloogiliste määramiste jaoks (vt tabelit 1 punktis 1.8.2.2), klaasnõud, kemikaalid ja reaktiivid on nõutavad vastavalt vajadusele.

⁽¹⁾ Kuna nimetatud leeliselised absorptsioonilahused absorbeerivad ka õhutamisega süsinikdioksiidi ning aeroobsetes katsedes hingamisel tekkinud süsinikdioksiidi, tuleb neid regulaarselt vahetada, et vältida nende küllastumist ja seega nende absorptsioonivõime hävimist.

▼B**1.8.2. Põhjasetete valik ja arv**

Proovivõtukohtade tuleks valida vastavalt katse eesmärgile igas nimeetatud olukorras. Proovivõtukohtade valikul tuleks kaaluda valglu ja vee ülesvoolu võimalikke põllumajanduslikke, tööstuslikke või kodumajapidamise sisendeid. Setteid ei tohiks kasutada, kui need on saastatud katseainega või selle struktuurse analoogiga viimase 4 aasta jooksul.

1.8.2.1. Sette valik

Tavaliselt kasutatakse aeroobsetes katsetes kahte setet (7). Need kaks setet peaksid erinema orgaanilise süsiniku sisalduse ja tekstuuri poolest. Ühel settel on kõrge orgaanilise süsiniku sisaldus (2,5–7,5 %) ja peen tekstuur, teisel on madal orgaanilise aine sisaldus (0,5–2,5 %) ja jäme tekstuur. Orgaanilise süsiniku sisaldused peaksid tavaliselt erinema vähemalt 2 %. „Peen tekstuur” tähendab määratluse järgi > 50 % [savi + aleuriidi] (!) sisaldust ja „jäme tekstuur” < 50 % [savi + aleuriidi] sisaldust. Kahe sette [savi + aleuriidi] sisaldus peaks tavaliselt erinema vähemalt 20 %. Juhul, kui kemikaal võib samuti jõuda merevette, peaks vähemalt üks põhjasete olema pärit merest.

Rangelt anaeroobses katses tuleks valida prooviks kaks setet (sh nendega seotud vesi) pinnaveemassist anaeroobselt alalt (7). Sette- ja veefaase tuleks käsitleda ja transportida ettevaatlikult hapnikuta tingimustes.

Muud parameetrid võivad olla tähtsad setete valikul ja neid tuleks arvesse võtta iga üksikjuhtumi puhul eraldi. Näiteks, setete pH-vahemik on tähtis selliste kemikaalide uurimisel, mille transformatsioon ja/või sorptsioon sõltub pH-st. Sorptsiooni pH-sõltuvust saab peegeldada katseaine pK_a väärtuses.

1.8.2.2. Põhjasette proovide kirjeldamine

Nii vee kui sette puhul peamised parameetrid, mida tuleb mõõta ja millest tuleb teatada (viidates katsemeetodile), ning katsetapp, milles need parameetrid määratakse, on esitatud kokkuvõtlikult siin toodud tabelis. Nende parameetrite määramismeetodid on toodud viidetes (18, 19, 20, 21).

Lisaks sellele võib osutada vajalikuks mõõta ja teatada ka muudest parameetritest iga juhtumi puhul eraldi (nt magevee puhul: osakesed, aluselised, kõvadus, elektrijuhtivus, NO_3/PO_4 (suhe ja üksikud väärtused); setete puhul: katioonvahetusvõime, veemahutavus, karbonaat, kogulämmastik ja -fosfor, ning merede puhul: soolsus). Setete või vee analüüs nitraadi, sulfaadi, biokättesaadava raua ja muude võimalike elektronaktseptorite kohta võib olla kasulik redokstingimuste hindamisel, eriti seoses anaeroobse transformatsiooniga.

(!) [Savi + aleuriit] on sette mineraalfraktsioon, mille osakeste suurus on < 50 µm.

▼B

Vee-setteproovide iseloomustamiseks kasutatavate parameetrite mõõtmine (7, 22, 23)

Parameeter	Katseprotseduuri etapp					
	väliproovide võtmine	järekkäsitlemine	kohanemise algus	katse algus	katse käigus	katse lõpp
Vesi						
Päritolu/allikas	X					
Temperatuur (°C)	X					
pH	X		X	X	X	X
Kogu orgaaniline süsinik			X	X		X
O ₂ kontsentratsioon (*)	X		X	X	X	X
Redokspotentsiaal (*)			X	X	X	X
Setted						
Päritolu/allikas	X					
Kihi sügavus	X					
pH		X	X	X	X	X
Osakeste jaotus		X				
Kogu orgaaniline süsinik		X	X	X		X
Mikroobi biomass (*)		X		X		X
Redokspotentsiaal (**)	Vaatlused (värv/lõhn)		X	X	X	X

(*) Aeroobsetes uuringutes mikroobide hingamiskiiruse meetod (26), suitsutusmeetod (27) või bakterite arvu määramine (nt bakterid, kiirikbakterid, seened ja kolooniate koguarv), anaeroobsetes uuringutes metanogeneesi kiirus.

(**) Viimased uurimustulemused on näidanud, et vee hapniku kontsentratsioonide ja redokspotentsiaalide mõõtmistel ei ole mehhanistlikku ega ennustatavat väärtust, kui käsitletakse mikroobipopulatsioonide kasvu ja arengut pinnaveses (24, 25). Biokeemilise hapnikutarbe (BOD – määramine väliproovide võtmisel, katse alguses või lõpus) ja mikro/makrotoitainete Ca, Mg ja Mn kontsentratsioonide määramine (katse alguses ja lõpus) vees ning kogulämmastiku ja kogukaaliumi mõõtmine setetes (väliproovide võtmise ajal ja katse lõpus) sobivad paremini aeroobse biotransformatsiooni kiiruste ja teede tõlgendamiseks ja hindamiseks.

1.8.3. Kogumine, käsitlemine ja säilitamine

1.8.3.1. Kogumine

ISO põhjasetteproovide võtmist käsitleva juhendi (8) eelnõud tuleks kasutada setteproovide võtmisel. Setteproovid tuleks võtta sette 5–10 cm ülemisest kihist. Settega seotud vesi tuleks koguda samast kohast ja samal ajal kui sete. Anaeroobse katse puhul tuleks sette- ja sellega seotud vee proove võtta ja transportida hapnikuta (28) (vt punkti 1.8.2.1). Mõningaid proovivõtuseadmeid on kirjeldatud kirjanduses (8, 23).

▼B1.8.3.2. *Käsitlemine*

Sete eraldatakse veest filtreerimise teel ja sete märgsõelutakse läbi 2 mm sõelaava, kasutades liigsed proovivõtukohest võetud vett, mis seejärel visatakse minema. Seejärel segatakse soovitud suhtes (vt punkti 1.9.1) sette ja vee teadaolevad kogused inkubatsioonikolbides ja valmistatakse ette kohanemiseks (vt punkti 1.8.4). Anaeroobse katse puhul tuleb sooritada kõik käsitlemisetapid hapniku puudumisel (29, 30, 31, 32, 33).

1.8.3.3. *Säilitamine*

Värskest võetud sette- ja veeproovide kasutamist soovitatakse väga, kuid kuna säilitamine on vajalik, tuleks sete ja vesi sõeluda selliselt, nagu on kirjeldatud eespool, ja säilitada koos, veega küllastatult (6–10 cm veekiht), pimedas, temperatuuril 4 ± 2 °C ⁽¹⁾ maksimaalselt 4 nädalat (7, 8, 23). Aeroobsetes katsetes kasutatud proovid tuleks säilitada vaba õhu juurdepääsuga (nt avatud mahutites), samas anaeroobsete katsete proovid tuleks säilitada ilma hapnikuta. Transportimisel ja säilitamisel ei tohi sette- või veeproove külmutada või setteproove kuivatada.

1.8.4. **Sette-/veeproovide katseks ettevalmistamine**

Kohanemisperiood peaks aset leidma enne katseaine lisamist, asetades iga sette-/veeproovi inkubatsiooninõusse, mida kasutatakse põhikatseks, ja kohanemine toimub täpselt samades tingimustes nagu katseinkubatsioon (vt punkti 1.9.1). Kohanemisperiood on aeg, mis kulub süsteemi mõistliku stabiilsuse saavutamiseks, mida peegeldavad pH, hapniku kontsentratsioon vees, sette- ja veeproovi redoxpotentsiaal ning faaside makroskoopiline eraldamine. Kohanemisperiood peaks tavaliselt kestma üks kuni kaks nädalat ja ei tohiks ületada nelja nädalat. Nimetatud perioodil tehtud määramiste tulemused tuleks teha teatavaks.

1.9. **KATSE KÄIK**1.9.1. **Katsetingimused**

Katse tehakse inkubatsiooniseadmes (vt punkti 1.8.1), milles vee ja sette mahusuhe on 3:1 ja 4:1 ning settekiht on 2,5 cm ($\pm 0,5$ cm) ⁽¹⁾. Vähemalt 50 g setet (kuivmass) inkubatsioonianuma kohta on soovitatav.

Katse tuleks sooritada pimedas konstantsel temperatuuril vahemikus 10–30 °C. Temperatuur (20 ± 2) °C on sobiv. Vajaduse korral võib kasutada täiendavaid madalamaid temperatuure (nt 10 °C) iga juhtumi puhul eraldi, sõltuvalt katse kohta nõutavast teabest. Inkubatsioonitemperatuuri tuleks jälgida ja sellest teatada.

⁽¹⁾ Viimased uuringud on näidanud, et säilitamine temperatuuril 4 °C võib põhjustada sette orgaanilise süsiniku sisalduse vähenemist, mille võimalikuks tulemuseks on mikroobide tegevuse vähenemine (34).

▼B**1.9.2. Katseaine töötlemine ja lisamine**

Kasutatakse kemikaali ühte katsekonsentratsiooni⁽¹⁾. Põllukultuuride kemikaalide puhul, mida lisatakse otse veemassi, tuleks tõlgendada suurima annusena märgistusel suurimat lisamiskiirust, mis on arvatud katseanuma vee pindala põhjal. Kõikidel muudel juhtudel peaks kasutatav kontsentratsioon põhinema keskkonnaemissioonidest tehtud ennustuste põhjal. Tuleks püüda tagada seda, et katseainet lisatakse piisavas kontsentratsioonis selleks, et iseloomustada transformatsiooniteed ning transformatsioonisaaduste teke ja vähenemist. Võib osutada vajalikuks lisada suuremaid annuseid (nt 10kordsed) olukordades, kus katseaine kontsentratsioonid on lähedal avastamispiiridele katse alguses ja/või kui peamisi transformatsioonisaaduseid ei suudeta kohe avastada, kuna nende kontsentratsioon on 10 % katseaine annusemäärast. Kui kasutatakse suuremaid kontsentratsioone, ei tohiks neil olla olulist negatiivset mõju vee-settesüsteemi mikroobide tegevusele. Katseaine konstantse kontsentratsiooni saamiseks erinevate mõõtmega anumates võib pidada vajalikuks lisatava aine koguse kohandamist, mis põhineb veesamba sügavusel anumal seoses vee sügavusega uuritavas keskkonnas (mis eeldatavasti on 100 cm, kuid võib kasutada ka muid sügavusi). Vt 4. lisa näidisarvutamise kohta.

Ideaaljuhul tuleks lisada katseainet vesilahusena katsetsüsteemi veefaasi. Kui see on vältimatu, on lubatud kasutada veega segunevate lahustite (nt atsetoon, etanool) väikeseid koguseid katseaine lisamiseks ja jaotamiseks, kuid see ei tohiks ületada 1 % v/v ja sellel ei tohiks olla kahjulikke mõjusid katsetsüsteemi mikroobide tegevusele. Katseaine vesilahus tuleks teha hoolikalt – täieliku homogeensuse tagamiseks võib vaja minna generaatorkolonne ja eelsegamist. Katsetsüsteemi vesilahuse lisamise järel on soovitatav veefaasi õrnalt segada, häirides setet nii vähe kui võimalik.

Preparaatide kasutamist tavaliselt ei soovitata, kuna preparaate koostisosad võivad mõjutada katseaine ja/või transformatsioonisaaduste jaotumist vee- ja settefaaside vahel. Nt nõrgalt veelahustuva katseaine puhul võib siiski kasutada preparaati sobiva alternatiivina.

Inkubatsioonianumate arv sõltub proovivõtukordade arvust (vt punkti 1.9.3). Katsetsüsteeme peaks olema piisavalt, et igal proovivõtukorral võib kasutada kahte süsteemi. Kui iga põhjasettesüsteemi kohta tehakse kontrollproovid, ei tohiks neid töödelda katseainega. Kontrollproove saab kasutada sette mikroobi biomassi ning vee- ja setteproovide orgaanilise süsiniku koguarvu määramiseks katse lõpus. Kahte kontrollproovi (s.t üks kontrollproov iga põhjasette kohta) saab kasutada nõutud parameetrite jälgimiseks settes ja vees kohanemise ajal (vt tabelit punktis 1.8.2.2). Tuleks teha kaks täiendavat kontrollproovi juhul, kui katseainet lisatakse lahusti abil, et mõõta kahjulikke mõjusid katsetsüsteemi mikroobide tegevusele.

⁽¹⁾ Katse tegemine teise kontsentratsiooniga võib olla kasulik kemikaalide puhul, mis jõuavad pinnavette erinevaid teid pidi oluliselt erinevate kontsentratsioonide tõttu, kuni saab analüüsida väiksemat kontsentratsiooni piisavalt täpselt.

▼B**1.9.3. Katse kestus ja proovide võtmine**

Katse ei tohiks tavaliselt kesta kauem kui 100 päeva (6) ning peaks jätkuma seni, kuni lagunemise ja vee/sette jaotamise kohta esitatakse selgitus või kui 90 % katseainest on hävinud transformatsiooni ja/või lendumise tõttu. Proovivõtukordade arv peaks olema vähemalt kuus (sealhulgas proovivõtu 0 kord), ja enne katset võib kasutada valikulist eelkatset (vt punkti 1.9.4), mille käigus määratakse asjaomased proovivõturežiimid ja katse kestus, välja arvatud juhul, kui katseaine kohta on olemas piisavalt andmeid eelnevatest uuringutest. Hüdrofoobsete katseainete puhul võib vaja minna täiendavaid proovivõtuhetki katse algperioodil, et määrata vee- ja settefaaside jaotamise kiirus.

Asjaomastel proovivõtuaegadel eemaldatakse analüüsis kõik inkubatsioonianumad (paralleelproovides). Setet ja selle peal olevat vett analüüsitakse eraldi ⁽¹⁾. Pinnavesi tuleks hoolikalt eemaldada setet minimaalselt häirides. Katseaine ja transformatsioonisaaduste ekstraheerimine ja karakteriseerimine peaksid järgima asjaomaseid analüütilisi protseduure. Tuleks hoolikalt eemaldada aine, mis võib olla adsorbeerunud inkubatsioonianumasse või lenduvate ainete püüdmissüsteemidesse.

1.9.4. Valikulised eelkatsed

Kui proovivõtu kestust ja režiimi ei saa hinnata muude, katseainet käsitlevate asjaomaste uuringute põhjal, võib pidada vajalikuks teha valikuline eelkatse, mis tuleks sooritada, kasutades samu katsetingimusi, mis on välja pakutud lõppuuringuks. Asjaomased katsetingimuste ja eelkatse tulemuste kohta, kui see on sooritatud) tuleks esitada lühiprotooll.

1.9.5. Mõõtmised ja analüüs

Katseaine ja transformatsioonisaaduste kontsentratsiooni igal proovivõtu korral vees ja settes tuleks mõõta ja neist teatada (lisatud kontsentratsiooni ja protsendimäärana). Üldiselt tuleks identifitseerida transformatsioonisaadused, mis on avastatud ≥ 10 %na radioaktiivsest ainest vee-sette koguproovis igal proovivõtuajal, kui seda ei ole mõistlikult teisiti põhjendatud. Transformatsioonisaaduseid, mille kontsentratsioonid katse käigus pidevalt kasvavad, tuleks samuti identifitseerimisel arvesse võtta, isegi siis, kui nende kontsentratsioonid ei ületa eespool toodud piirnorme, kuna see võib viidata aine püsivusele. Viimast tuleks arvesse võtta iga juhtumi puhul eraldi, tuues põhjendused protokollis.

Gaaside/lenduvate ainete püüdmissüsteemide (CO₂ ja muud, s.t. lenduvad orgaanilised ühendid) tulemustest tuleks teatada igal proovivõtuajal. Tuleks teatada ka mineralisatsioonikiirus. Ekstraheerimata (seotud) jääkidest settes tuleks teatada igal proovivõtuhetkel.

⁽¹⁾ Kui võib toimuda kiire anaeroobsete transformatsioonisaaduste reoksüdeerumine, tuleks säilitada anaeroobsed tingimused proovivõtu ja analüüsimise ajal.

▼B**2. TULEMUSED****2.1. TULEMUSTE TÖÖTLEMINE**

Lisatud radioaktiivse aine kogu ainetase või saagis (vt punkti 1.7.1) arvutatakse igal proovivõtukorral. Tulemustest tuleks teada anda lisatud radioaktiivse aine protsendimäärana. Radioaktiivse aine jaotamisest vee ja sette vahel tuleks teatada kontsentratsioonide ja protsendimääradena igal proovivõtukorral.

Katseaine poolestusaeg, DT_{50} ja vajaduse korral DT_{75} ja DT_{90} tuleks arvutada koos usalduspiiridega (vt punkti 1.7.3). Teavet katseaine hävimiskiiruse kohta vees ja settes võib saada sobivate hindamisprotseduuride abil. Nende hulka kuuluvad näiline esimese astme kineetika, graafilisi või numbrilisi lahendeid kasutavad empiirilised kõvera moodustamise tehnika ning keerukamad hindamised, näiteks ühe või mitme lahtriga näidised. Täiendavaid üksikasju võib leida asjaomasest avaldatud kirjandusest (35, 36, 37).

Kõikidel lähenemistel on oma tugevad ja nõrgad küljed ning need erinevad märkimisväärselt oma keerukuse poolest. Esimese astme kineetika võib lagundamis- ja jaotamisprotsesse liiga lihtsustada, kuid võimaluse korral lisab suuruse (kiirusekonstant või poolestusaeg), mis on hõlpsasti mõistetav ja mis on väärtuslik simulatsioonimudelite koostamisel ja prognoositavate arvutuskontsentratsioonide arvutamisel. Empiiriliste lähenemiste või lineaarsete transformatsioonide käigus võidakse saada andmete jaoks paremini sobivaid kõveraid ja seetõttu hinnata paremini poolestusaegasid, DT_{50} ja vajaduse korral DT_{75} ja DT_{90} väärtusi. Tuletatud konstantide kasutamine on siiski piiratud. Lahternäidiste abil võib luua riski hindamise jaoks kasulikke, väärtuslikke konstante, mis kirjeldavad lagunemiskiirust erinevates sektorites ja kemikaali jaotust. Neid tuleks samuti kasutada kiiruskonstantide hindamiseks peamiste transformatsioonisaaduse tekkel ja lagunemisel. Kõikidel juhtudel tuleb valitud meetodit põhjendada ja eksperimenteerija peaks graafiliselt ja/või statistiliselt esitama sobivuse headuse.

3. PROTOKOLL**3.1. KATSEPROTOKOLL**

Protokoll peab sisaldama järgmist teavet.

Katseaine:

— üldnimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuuri-valem (tuues ära märgi/märkide asukohta, kui kasutatakse radiomärgistatud ainet) ja asjaomased füüsikalise-keemilised omadused;

— katseaine puhtus (lisandid);

— märgistatud kemikaali radiokeemiline puhtus ja molaarne aktiivsus (vajaduse korral).

▼B

Võrdlusained:

- selliste võrdlusainete keemiline nimetus ja struktuur, mida kasutatakse transformatsioonisaaduste kirjeldamiseks ja/või identifitseerimiseks.

Uuritavad setted ja veed:

- põhjasettest proovide võtmise koha (kohtade) asukoht ja kirjeldus, sh võimaluse korral saastumise ajalugu;
- kogu teave vee-settesüsteemide kogumise, säilitamise (kui säilitatakse) ja kohanemise kohta;
- vee-setteproovide tunnused, mis on loetletud punkti 1.8.2.2 tabelis.

Katsetingimused:

- kasutatud katsesüsteem (nt möödavool, biomeeter, õhutamisviis, segamismeetod, veemaht, settemass, nii vee- kui ka settekihi paksus, katseanumate mõõdud jne);
- katseaine lisamine katsesüsteemi: kasutatud katsekonsentratsioon, paralleelproovide ja kontrollproovide arv, katseaine lisamisviis (nt lahusti abil, kui seda kasutatakse) jne;
- inkubatsioonitemperatuur;
- proovivõtuajad;
- ekstraheerimismeetodid ja -tõhusused ning analüüsimeetodid ja avastamispiirid;
- transformatsioonisaaduste kirjeldamise/identifitseerimise meetodid;
- kõrvalekalded katseprotokollist või katsetingimustest katse käigus.

Tulemused:

- representatiivsete analüüside töötlemata andmed (kõik töötlemata andmed tuleb säilitada labori arhiivis);
- kasutatud analüüsimeetodite korratavus ja tundlikkus;
- saagisemäärad (valiidse katse protsendimäärad on toodud punktis 1.7.1);
- tulemused tabeli kujul, väljendatuna katseaine ja vajaduse korral transformatsioonisaaduste ning ekstraheerimata radioaktiivsete ainete protsendimäärana lähteannusest ja vajaduse korral $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ vees, settes ja kogu süsteemis (vaid protsendina);
- ainetase uuringute kestel ja lõpus;
- vee- ja settefraktsioonides ning kogu süsteemis toimunud transformatsiooni (sh mineralisatsiooni) graafiline esitamine;
- mineralisatsioonikiirused;

▼B

- katseaine ja vajaduse korral peamiste transformatsioonisaaduste poolestusaeg, DT₅₀ ja vajaduse korral DT₇₅ ja DT₉₀ väärtused, kaasa arvatud usalduspiirid vees, settes ja kogu süsteemis;
- hinnang katseaine ja vajaduse korral peamiste transformatsioonisaaduste transformatsioonikineetika kohta;
- vajaduse korral eeldatavad transformatsiooniteed;
- tulemuste arutelu.

4. **VIITED**

- 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.EA.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.EA.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. *Chemosphere* 27, 1499–1509.

▼B

- 32) Nuck, BA. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ¹⁴C-radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. *Environ. Sci. Technol.* 30, 3597–3603.
- 33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.
- 34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961–968.
- 35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 39, 187–203.
- 36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 33, 47–60.
- 37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases, pp. 1349–1354.

▼B*1. liide***JUHEND AEROOBSETE JA ANAEROOBSETE KATSESÜSTEEMIDE KOHTA****Aerobne katsesüsteem**

Käesolevas meetodis kirjeldatud aerobne katsesüsteem sisaldab aeroobset veekihti (tüüpilised hapniku kontsentratsioonid on vahemikus 7–10 mg·l⁻¹) ja settekihti, mis on aerobne pinnal ja anaerobne pinna all (tüüpilised keskmised redokspotentsiaalid (E_h) sette anaeroobsel alal on vahemikus – 80 kuni – 190 mV). Igas inkubatsiooniüksuses viiakse niisutatud õhk veepinnale piisava hapniku säilitamiseks õhuruumis.

Anaerobne katsesüsteem

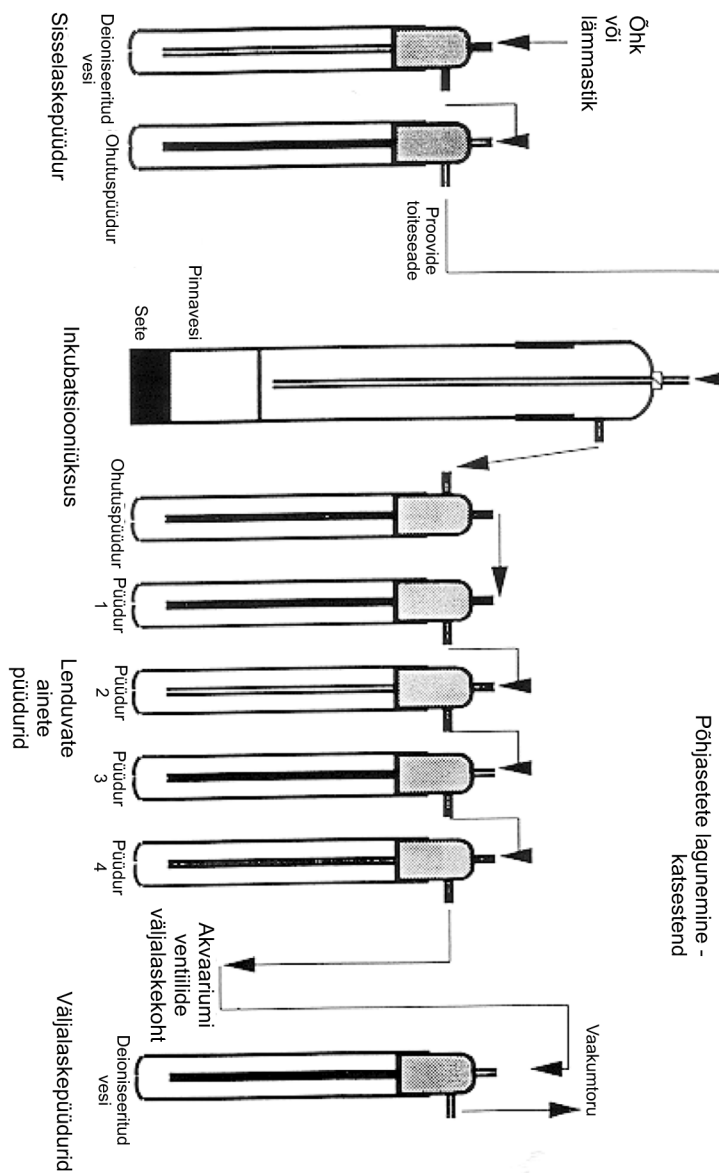
Anaerobse katsesüsteemi puhul on katseprotseduur oma olemuselt samasugune kui aeroobses süsteemis, erandiks on see, et igas inkubatsiooniüksuses viiakse niisutatud lämmastik veepinnale lämmastiku õhuruumi säilitamiseks. Setet ja vett käsitletakse anaeroobsena, kui redokspotentsiaal (E_h) on madalam kui – 100 mV.

Anaeroobses katses sisaldab mineralisatsiooni hindamine tekkinud süsinikdioksiidi ja metaani mõõtmisi.

▼B

2. liide

GAASI MÖÖDAVOOLUSEADME NÄIDIS



Ohutuspüüdur, tühi

Püüdur 1:

etüleenglükool lenduvate orgaaniliste ainete püüdmiseks

Püüdur 2:

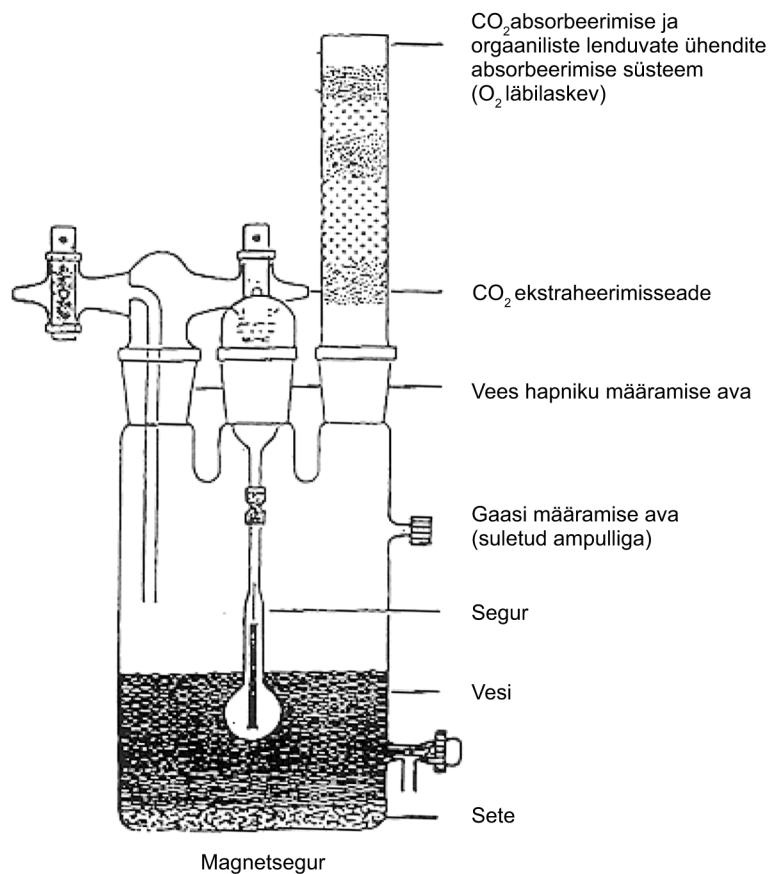
väävelhape 0,1 M aluseliste lenduvate ainete püüdmiseks

Püüdurid 3 ja 4 %:

naatriumhüdroksiid 2M CO₂ ja muude happeliste lenduvate ainete püüdmiseks

▼ B

3. liide

BIOMEETRI NÄIDIS

▼B

4. Liide

NÄIDISARVUTUS	KATSEAINE KATSEANUMATESSE	ANNUSTAMISE	KOHTA
Silindri siseläbimõõt:		= 8 cm	
Veesamba sügavus, v.a sete:		= 12 cm	
Pindala: $3,142 \times 4^2$		= 50,3 cm ²	
Annusmäär: 500 g katseainet ha kohta vastab 5 µg/cm ²			
Kokku µg: $5 \times 50,3$		= 251,5 µg	
Kohandada kogust seoses 100 cm sügavusega: $12 \times 251,5 \div 100$		= 30,18 µg	
Veesamba maht: $50,3 \times 12$		= 603 ml	
Kontsentratsioon vees: $30,18 \div 603$		= 0,050 µg/ml või 50 µg/l	

▼ **M1****C.25. AEROOBNE MINERALISEERUMINE PINNAVEES – BIOLAGUNEMISE MUDELKATSE****1. METOODIKA**

Käesolev meetodika on samaväärne standardiga OECD TG 309 (2004) (1).

1.1. SISSEJUHATUS

Käesoleva katse eesmärk on mõõta uuritava aine biolagunemise sõltuvust ajast aeroobses looduslikus vees madalatel kontsentratsioonidel ja väljendada mõõtmistulemused kineetiliste seoste vormis. Käesolev mudelkatse on laboratoorne loksutatavas kolvis läbiviidav portskatse, millega saab määrata orgaanilise aine aeroobse biolagunemise kiiruse loodusliku pinnavee (mage-, riim- või merevee) proovides. Meetodika põhineb standardil ISO/DIS 14592-1 (2), kuid sisaldab ka meetodikate C.23 ja C.24 elemente (3, 4). Uuritava mikrokosmi seisundi halvenemise vältimiseks võib pika katseaja korral asendada portsrežiimi poolpideva režiimiga, kuid see ei ole kohustuslik. Mudelkatse peamine eesmärk on määrata uuritava aine mineraliseerumine pinnavees ja esitada selle alusel lagunemise kineetika. Katse teine (mittekohustuslik) eesmärk võib olla teabe saamine esmase lagunemise ja oluliste muundumissaaduste kohta. Muundumissaaduste kindlakstegemine ja võimaluse korral nende sisalduse määramine on eriti oluline väga aeglaselt mineraliseeruvate ainete puhul (ained, mille ¹⁴C-märgisega jäägi üldine poolestusaeg on üle 60 ööpäeva). Oluliste muundumissaaduste kindlakstegemiseks ja mõõtmiseks tuleb analüüsimeetodite piiratud võimaluste tõttu kasutada tavaliselt kõrgemaid uuritava aine kontsentratsioone (> 100 µg/l).

Käesoleva katse puhul tähendab madal kontsentratsioon uuritava aine sisaldust (1–100 µg/l), mis on nii madal, et katses saadud biolagunemise kineetika võiks kajastada eeldatavat kineetikat keskkonnas. Looduslikus katsevees leiduvate biolagundatavate süsiniksubstraatide üldmassiga võrreldes on madala kontsentratsiooniga uuritav aine sekundaarne substraat. Sellest järeldub, et biolagunemise kineetika on eeldatavalt esimest järku („ilma kasvuta kineetika“) ja uuritav aine laguneb „kometabolismi“ teel. Esimest järku kineetika tähendab, et lagunemise kiirus (mg/l/ööpäev) on aja jooksul väheneva substraadi kontsentratsiooniga võrdeline. Tõelise esimest järku kineetika puhul on konkreetse aine lagunemise kiiruskonstant k sõltumatu ajast ja kontsentratsioonist. See tähendab, et k ei muutu märkimisväärselt katse jooksul ja on samasugune ka kõrgematel kontsentratsioonidel läbiviidud eri katsete puhul. Definitsiooni järgi on lagunemise kiiruskonstant k võrdne kontsentratsiooni suhtelise muutusega ajaühiku kohta: $k = (1/C) \cdot (dC/dt)$. Kuigi ettenähtud tingimustes on eeldatav kineetika tavaliselt esimest järku, võib esineda teatavaid olukordi, kus andmeid kirjeldab paremini muud tüüpi kineetika. Kõrvalekalle esimest järku kineetikast võib ilmneda näiteks siis, kui biomuundumist ei limiteeri bioloogilise reaktsiooni kiirus, vaid mingi massiülekanne nähtus, nagu difusiooni kiirus. Siiski võib katseandmeid peaaegu alati kirjeldada pseudo-esimest järku kineetika abil, kui eeldada, et kiiruskonstant sõltub kontsentratsioonist.

▼ **M1**

Katseplaani koostamise ja tulemuste tõlgendamise hõlbustamiseks peavad enne katset olema olemas (nt standardsetest sõelkatsetest saadud) andmed uuritava aine biolagundatavuse kohta kõrgematel kontsentratsioonidel, abiootilise lagundatavuse, muundumissaaduste ja oluliste füüsikalise-keemiliste omaduste kohta. Täieliku biolagundatavuse määramiseks kasutatakse ^{14}C -märgisega uuritavat ainet ja määratakse ^{14}C jaotumine faaside vahel katse lõpus. Märgiseta uuritava aine puhul saab täielikku biolagundatavust määrata ainult kõrgete kontsentratsioonide kasutamisel ja tingimusel, et kõik olulised muundumissaadused on teada.

1.2. MÕISTED

Esmane biolagunemine on keemilise aine struktuuri muutumine (muundumine) mikroorganismide toimel, mille tulemusel aine kaotab oma keemilise identiteedi.

Funktsionaalne biolagunemine on keemilise aine struktuuri muutumine (muundumine) mikroorganismide toimel, mille tulemusena aine kaotab teatava omaduse.

Täielik aeroobne biolagunemine on hapniku juuresolekul mikroorganismide abil toimuv keemilise aine lagunemine (mineraliseerimine) süsinikdioksiidiks, veeks ja muude aines esinevate elementide anorgaanilisteks sooladeks ning uute mikrobioloogilise sünteesi produktide ja biomassi teke.

Mineraliseerumine on keemilise aine või orgaanilise materjali lagunemine süsinikdioksiidiks, veeks ja muude aines esinevate elementide anorgaanilisteks sooladeks mikroorganismide toimel.

Ootefaas on aeg katse algusest kuni hetkeni, millal lagundava toimega mikroorganismid on kohanenud ja keemilise aine või orgaanilise materjali biolagunemine on jõudnud avastatava tasemeni (10 protsendini maksimaalsest teoreetilisest lagunemisest või vähem, olenevalt mõõtemetodi täpsusest).

Maksimaalne biolagunemise tase on keemilise aine või orgaanilise materjali katses registreeritud biolagunemise määr protsentides, millest edasi biolagunemine katses enam ei lähe.

Primaarne substraat on looduslike süsiniku- ja energiaallikate kogum, mis tagab mikroorganismide biomassi kasvu ja elutegevuse.

Sekundaarne substraat on nii madala kontsentratsiooniga substraadikomponent, et selle lagundamisest saavad asjaomased mikroorganismid üksnes tähtsusetu koguse süsinikku ja energiat, võrreldes süsiniku- ja energiakogusega, mille nad saavad substraadi peamiste komponentide (primaarsete substraatide) lagundamisest.

Lagunemise kiiruskonstant on esimest või pseudo-esimest järku kiiruskonstant k (ööpäev $^{-1}$), mis näitab lagunemise kiirust. Porskatsetes määratakse k pärast ootefaasi saadud lagunemiskõvera esimese osa alusel.

▼ M1

Poolestusaeg $t_{1/2}$ (ööpäev) on mõiste, mida kasutatakse esimest järku reaktsiooni kiiruse iseloomustamiseks. See on aeg, mille jooksul aine kontsentratsioon väheneb kaks korda. Poolestusaeg ja lagunemise kiiruskonstant on seotud valemiga $t_{1/2} = \ln 2/k$.

Poollagunemisaeg, DT_{50} (ööpäev) on mõiste, mida kasutatakse biolagunemiskatse tulemuse väljendamiseks. See on 50-protsendiliseks biolagunemiseks vajalik aeg (koos ootefaasiga).

Avastamislävi ja mõõtmislävi. Avastamislävi on aine kontsentratsioon, millest madalamal väärtusel ei saa aine identisust tõendavat signaali eristada analüüsi artefaktidest. Mõõtmislävi on aine kontsentratsioon, millest madalamal väärtusel ei saa kontsentratsiooni määrata nõutava täpsusega.

Lahustunud orgaaniline süsinik on veeproovis leiduva orgaanilise süsiniku osa, mida ei saa eemaldada teatava faaside eraldamisviisi abil, näiteks tsentrifuugimisega $40\,000\text{ ms}^{-2}$ juures 15 minuti jooksul või filtrimisega läbi membraani, mille poori läbimõõt on 0,2–0,45 μm .

Orgaanilise ^{14}C üldaktiivsus on orgaanilise süsinikuga seotud ^{14}C üldaktiivsus.

Lahustunud orgaanilise ^{14}C aktiivsus on lahustunud orgaanilise süsinikuga seotud ^{14}C üldaktiivsus.

Tahkete osakestega seotud orgaanilise ^{14}C aktiivsus on tahkete osakestega seotud orgaanilise ^{14}C üldaktiivsus.

1.3. KATSE RAKENDATAVUS

Kõnesolev mudelkatse on rakendatav lendumatu või vähelenduva orgaanilise aine madalate kontsentratsioonide puhul. Atmosfääriõhule avatud kolvi (nt puuvillvatikorgiga kolvi) puhul võib praktiliselt lendumatuks pidada ainet, mille Henry konstant on väiksem kui umbes $1\text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ (umbes $10^{-5}\text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$). Kui kasutatakse suletud kolbi vaba ruumiga ülaosas, on võimalik uurida ka väheleenduvaid aineid (Henry konstant $< 100\text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ või $< 10^{-3}\text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$), ilma et süsteemist läheks ainet kaduma. Kui CO_2 eemaldamisel ei kasutata vajalikke ettevaatusabinõusid, võib ^{14}C -märgisega ainet siiski kaotsi minna. Sel juhul võib olla vaja püüda CO_2 leelist sisaldavasse siseabsorberisse või kasutada välist CO_2 absorberit (otsene $^{14}\text{CO}_2$ määramine, vt 3. liide). Biolagunemise kineetika määramiseks peab uuritava aine kontsentratsioon olema madalam selle aine lahustuvusest vees. Tuleb siiski märkida, et kirjanduses esitatud vesilahustuvus võib olla oluliselt suurem uuritava aine lahustuvusest looduslikus vees. Väga halvasti lahustuva uuritava aine puhul võib lahustuvuse määramiseks kasutada sama vett, mida kasutatakse katses, kuid see ei ole kohustuslik.

Käesolevat meetodikat võib kasutada biolagunemise modelleerimiseks suuremaid osakesi mittesisaldavas pinnavees („pelaagiline katse“) või häguses pinnavees, mis võib esineda vee ja sette piirpinna läheduses (hõljumikatse).

▼ **M1**

1.4. KATSE PÕHIMÕTE

Portskatses inkubeeritakse uuritavat ainet kas ainult pinnavees (pelaagiline katse) või pinnavees, millele on lisatud hõljuvainet (hõljumit) ja/või setet, nii et selle kuivmassi sisaldus on 0,01–1 g/l (hõljumikatse); viimasel juhul modelleeritakse veekogu, milles on hõljumit või taassuspendeeritud setet. Enamasti on pinnavee hõljumi ja/või hõljuvsete sisaldus eespool märgitud vahemiku madalamas osas. Katsekolbe inkubeeritakse valguse juurdepääsuta keskkonnamperatuuril aeroobsetes tingimustes, segamisega. Lagunemise kineetika määratakse vähemalt kahel uuritava aine kontsentratsioonil. Kontsentratsioonid peavad teineteisest erinema 5–10 korda ja vastama uuritava aine eeldatavale kontsentratsioonivahemikule keskkonnas. Uuritava aine maksimaalne kontsentratsioon ei tohi ületada 100 µg/l ja on parem, kui see on alla 10 µg/l, kuna sel puhul vastab biolagunemine esimest järku kineetikale. Minimaalne kontsentratsioon ei tohi ületada 10 µg/l ja on parem, kui see on 1–2 µg/l või isegi madalam kui 1 µg/l. Müügilolevate ¹⁴C-märgisega ainete kasutamisel saab nii madalaid kontsentratsioone tavaliselt hästi määrata. Muude analüüsimeetodite piiratud võimaluste tõttu on sageli võimatu mõõta uuritava aine kontsentratsiooni vajaliku täpsusega, kui selle algkontsentratsioon on ≤ 100 µg/l (vt punkt 1.7.2, teine lõik). Kui ei ole piisavalt madala avastamislävega analüüsimeetodit, siis võib oluliste muundumissaaduste identifitseerimiseks ja sisalduse mõõtmiseks kasutada uuritava aine kõrgemaid kontsentratsioone (> 100 µg/l, mõnikord > 1 mg/l). Kui kasutatakse uuritava aine kõrget kontsentratsiooni, siis ei saa katsetulemustest võib-olla hinnata lagunemise esimest järku kiiruskonstanti ja poolestusaega, kuna lagunemine tõenäoliselt ei vasta esimest järku kineetikale.

Lagunemist registreeritakse sobiva aja tagant, mõõtes kas ¹⁴C jääkaktiivsust või (kui kasutatakse spetsiifilist keemilist analüüsi) uuritava aine jääkkontsentratsiooni. Kõige stabiilsema molekuliosa märgistamine ¹⁴C-ga võimaldab mõõta täielikku mineraliseerumist, samas kui vähem stabiilse molekuliosa märgistamine ¹⁴C-ga või spetsiifilise analüüsimeetodi kasutamine võimaldab hinnata esmast biolagunemist. Kõige stabiilsem molekuliosa ei pruugi siiski sisaldada olulist funktsionaalosa, mida võib seostada aine teatava eriomadusega, nagu toksilisus, bioakumulatsioon jne. Selle eriomaduse kao jälgimiseks võib niisugusel juhul olla vaja kasutada ¹⁴C-märgistatud funktsionaalosa uuritavat ainet.

1.5. ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

Käesolevas katses võib kasutada nii radioaktiivse märgisega kui ka märgiseta aineid. Soovitatakse kasutada märgistamist ¹⁴C-ga, kusjuures märgis peab tavaliselt asuma kõige stabiilsemas (stabiilsemates) molekuli osas (osades) (vt ka punkt 1.4). Rohkem kui ühe aromaatses tsükliga molekulis on soovitatav märgistada ¹⁴C-ga üks või mitu süsinikku igas tsükliis. Lisaks on soovitatav märgistada ¹⁴C-ga üks või mitu süsinikku mõlemal pool kergesti lõhustatavat sidet. Uuritava aine keemiline ja radiokeemiline puhtusaste peab olema > 95 %. Et hõlbustada ¹⁴C mõõtmist madala algkontsentratsiooniga katsetes, kasutatakse radiomärgisega aineid, mille eriaktiivsus on eelistatavalt umbes 50 µCi/mg (1,85 MBq) või kõrgem. Uuritava aine kohta on vaja teada järgmist:

▼ M1

- lahustuvus vees [metoodika A.6];
- lahustuvus orgaanilises (orgaanilistes) lahustis (lahustites) (aine puhul, mida lisatakse lahustis või mis lahustub vees halvasti);
- dissotsiatsioonikonstant (pKa), kui aine seob või loovutab kergesti prootoneid [OECD TG 112] (5);
- aururõhk [metoodika A.4] ja Henry konstant;
- keemiline püsivus vees valguse juurdepääsuta (hüdrolüüs) [metoodika C.7].

Kui uuritakse vees vähelahustuva aine lagunemist merevees, võib olla kasulik teada ka soolamiskonstanti (Setšenovi konstant) K^s , mis on määratud valemiga $\log(S/S') = K^s C_m$, kus S ja S' on aine lahustuvus vastavalt magedas vees ja merevees ja C_m on soola molaarne kontsentratsioon.

Hõljumikatse puhul on vaja teada ka järgmist:

- jaotuskoefitsient süsteemis n-oktaanol-vesi [metoodika A.8];
- adsorptsioonikoefitsient [metoodika C.18].

Kasulik on teada veel järgmist:

- uuritava aine kontsentratsioon keskkonnas, kui see on teada või seda on hinnatud;
- uuritava aine toksilisus mikroorganismidele [metoodika C.11];
- kergbiolagundatavus ja/või loomulik biolagundatavus [metoodikad C.4 A–F, C.12, C.9, OECD TG 302 (5)];
- aeroobne või anaeroobne biolagundatavus mullas ja muundumiskatsed süsteemis setted-vesi [metoodikad C.23, C.24].

1.6. STANDARDINE

Tavaliselt kasutatakse standardina aeroobsetes tingimustes kergesti biolagundatavat ainet (nt aniliin või naatriumbensoat). Aniliini ja naatriumbensoadi eeldatav biolagunemise aeg on tavaliselt alla kahe nädala. Standardinega kontrollitakse, et katses kasutatava vee mikroorganismide aktiivsus oleks teatavates piirides, st et vees oleks aktiivne mikroorganismide populatsioon.

▼ **M1**

1.7. KVALITEEDIKRITEERIUMID

1.7.1. **Saagis**

Pärast uuritava aine lisamist kontrollitakse iga katsetatavat algkontsentratsiooni kohe ^{14}C aktiivsuse mõõtmisega või, märgistamata aine puhul, keemilise analüüsiga vähemalt kahes paralleelproovis. Nii saadakse andmeid asjaomase analüüsimeetodi rakendatavuse ja korratavuse ning uuritava aine jaotuse ühtluse kohta. Edasisel andmete analüüsil ei kasutata tavaliselt nominaalset kontsentratsiooni, vaid mõõdetud ^{14}C algaktiivsust või uuritava aine algkontsentratsiooni, kuna sellega kompenseeritakse sorptsioonist tingitud ainekaod ja doseerimisvead. ^{14}C -märgisega uuritava aine korral võib aine saagise katse lõpus leida massibilansi koostamisega (vt punkt 1.8.9.4, viimane lõik). Paremal juhul on radiomärgisega aine massibilansist leitud saagis 90–110 %, samas kui radiomärgiseta aine saagis on olenevalt analüüsimeetodi täpsusest 70–110 %. Neid vahemikke ei tule pidada katse nõuetele vastavuse kriteeriumideks; neid tuleb tõlgendada sihtvahemikena. Analüüsi täpsuse võib määrata ka algkontsentratsioonist madalamal uuritava aine kontsentratsioonil ning oluliste muundumissaaduste puhul, kuid see ei ole kohustuslik.

1.7.2. **Analüüsimeetodi korratavus ja tundlikkus**

Et kontrollida analüüsimeetodi korratavust uuritava aine ja vajaduse korral, muundumissaaduste sisalduse mõõtmisel (kaasa arvatud esmase ekstraheerimise tõhusus), tehakse viis pinnavee üksikekstraktide paralleelanalüüsi.

Võimaluse korral ei tohiks uuritava aine ja muundumissaaduste puhul analüüsimeetodi avastamislävi olla kõrgem kui 1 % katseteemi lisatud aine algkontsentratsioonist. Mõõtmislävi ei tohiks ületada 10 % algkontsentratsioonist. Paljude orgaaniliste ainete ja nende muundumissaaduste keemiliseks analüüsiks on sageli vaja, et lisatud uuritava aine algkontsentratsioon oleks suhteliselt kõrge (> 100 µg/l).

1.8. KATSEMEETODI KIRJELDUS

1.8.1. **Seadmed**

Katse tehakse vajaliku mahuga (nt 0,5- või 1,0-liitrites) silikoon- või kummikorgiga suletud koonilistes kolbides, silindrikujulistes pudelites või CO_2 -kindlalt (nt butüülkummist septumiga) suletud seerumipudelites. Üks võimalus on teha katse suure arvu nõudega ja võtta igal proovivõtuajal prooviks vähemalt kahe paralleelnõu kogu sisu (vt punkt 1.8.9.1, viimane lõik). Radiomärgiseta lendumatu uuritava aine korral ei ole gaasikindel kork või septum vajalik, selle asemel sobib mittetihe puuvillvatikork, mille abil välditakse saastumist õhu kaudu (vt punkt 1.8.9.1, teine lõik). Vähelenduvaid aineid katsetatakse biomeetriaadse seadmes, milles veepinda nõrgalt segatakse. Bakttersaaste vältimiseks võib katsenõu enne kasutamist steriliseerida kuumutamise või autoklaavimisega, kuid see ei ole kohustuslik. Lisaks sellele kasutatakse järgmisi tavalisi laboriseadmeid:

— plaatloksuti või magnetsegajad katsenõude pidevaks segamiseks;

▼ M1

- tsentrifuug;
- pH-meeter;
- turbidimeeter hägususe nefelomeetriliseks määramiseks;
- ahi või mikrolaineahi kuivmassi määramiseks;
- membraanfiltrimise seade;
- autoklaav või ahi klaasnõude kuumsteriliseerimiseks;
- vahendid ^{14}C -märgisega aine käitlemiseks;
- seade ^{14}C aktiivsuse mõõtmiseks süsinikdioksiidi neelavast lahusest võetud proovis ja vajaduse korral setteproovis;
- analüüsiseade uuritava ja standardaine määramiseks, kui kasutatakse spetsiifilist keemilist analüüsi (nt gaasikromatograaf, kõrgefektiivne vedelikkromatograaf).

1.8.2. Uuritava aine põhilahus

Uuritava ja standardaine põhilahuste valmistamiseks kasutatakse deioniseeritud vett (vt punkt 1.8.7, esimene lõik). Deioniseeritud vesi ei tohi sisaldada mikroorganismidele mürgiseid aineid ning üle 1 mg/l lahustunud orgaanilist süsinikku (6).

1.8.3. Pinnavee võtmine ja vedu

Pinnavee võtmise koht valitakse igal konkreetsel juhtumil vastavalt katse eesmärgile. Veevõtukohta valikul tuleb arvestada võimalikke varasemaid põllumajanduse, tööstuse või olmemõjusid. Kui on teada, et eelneva nelja aasta jooksul saastati veekogu uuritava ainega või selle struktuurianaloogidega, ei tohi sellest veekogust katseveet võtta, välja arvatud juhul, kui uurija eesmärk ongi lagunemiskiiruse kindlakstegemine eelnevalt saasteainega kokku puutunud keskkonnas. Veevõtukohas mõõdetakse vee pH ja temperatuur. Registreeritakse proovivõtu sügavus ja antakse veeproovi väline iseloomustus (nt värvus ja hägusus) (vt punkt 3). Aeroobsete tingimuste olemasolu tõendamiseks mõõdetakse hapnikusisaldus ja/või redokspotentsiaal vees ja setete pinnakihis, kui aeroobsete tingimuste olemasolu ei ole ilmne juba eelnevast kogemusest ning veevõtukohta laadist. Pinnaveet veetakse täiesti puhtas nõus. Transpordi ajal ei tohi proovi temperatuur oluliselt ületada katsetemperatuuri. Kui vedu kestab üle 2–3 tundi, soovitatakse proov jahutada temperatuurini 4 °C. Veeproovi ei tohi külmutada.

▼ M1**1.8.4. Pinnavee hoidmine ja ettevalmistamine**

Katset on parem alustada üks ööpäev pärast proovivõttu. Kui vett on vaja säilitada, peab säilitusaeg olema võimalikult lühike ja ei tohi ületada nelja nädalat. Säilitamisel aereeritakse veeproovi 4 °C juures kuni kasutamiseni. Enne kasutamist kõrvaldatakse veeproovist suuremad tahked osakesed näiteks filtrimisega läbi nailonfiltri, mille ava läbimõõt on umbes 100 µm, läbi suurepöörilise paberfiltri või sadestamisega.

1.8.5. Sette lisamine veele (mittekohustuslik)

Hõljumikatseks vajaliku suspensiooni saamiseks lisatakse looduslikku vett sisaldavasse nõusse pindmist setet (mis on filtritud suuremate tahkete osakeste eemaldamiseks vastavalt punktile 1.8.4); suspendeeritud tahke aine sisaldus peab olema vahemikus 0,01–1 g/l. Pindmine sete peab pärinema veeprooviga samast kohast. Olenevalt konkreetsest veekeskkonnast võib pindmine sete olla suure orgaanilise süsiniku sisalduse (2,5–7,5 %) ja peeneteralise lõimisega või väikese orgaanilise süsiniku sisalduse (0,5–2,5 %) ja jämeteralise lõimisega (3). Pindmine sete valmistatakse ette järgmiselt: läbipaistva plasttoru abil võetakse mitu settesüdamikku; kohe pärast proovi võtmist lõigatakse ära iga südamiku ülemine aeroobne osa (kuni 5 mm paksune pindmine kiht) ja segatakse need osad kokku. Saadud setteproovi transportitakse nõus, mille ülaosas on palju õhuga täidetud ruumi, mis tagab settele aeroobsed tingimused (kui vedu kestab üle 2–3 tunni, jahutatakse nõu temperatuurini 4 °C). Setteproov suspendeeritakse uuritavas vees, nii et proovi ja vee suhe oleks 1:10, ja hõljumit aereeritakse 4 °C juures kuni kasutamiseni. Kui setet on vaja säilitada, peab säilitusaeg olema võimalikult lühike ega tohi ületada nelja nädalat.

1.8.6. Poolpidev menetlus (mittekohustuslik)

Kui uuritava aine olulist lagunemist on võimalik mõõta alles pärast pika ootefaasi möödumist, võib olla vajalik pikk inkubatsiooniperiood (mitu kuud). Kui see on teada uuritava ainega tehtud eelkatsetest, võib katse alguses kasutada poolpidevat režiimi, milles osa katseveest või hõljumit perioodiliselt uuendatakse (vt 2. liide). Teine võimalus on muuta tavaline portskatse poolpidevaks pärast seda, kui umbes 60 katsepäevaga ei ole portsrežiimis saavutatud uuritava aine lagunemist (vt punkt 1.8.8.3, teine lõik).

1.8.7. Uuritava aine (või standardaine) lisamine

Kui uuritav aine lahustub vees hästi ($> 1 \text{ mg/l}$) ja on vähelenduv (Henry konstant $< 1 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ või $< 10^{-5} \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$), võib põhilahuse valmistada deioniseeritud vees (vt punkt 1.8.2); vajaliku kontsentratsiooni saamiseks lisatakse katsenõusse vajalik maht põhilahust. Lisatava põhilahuse maht peab olema võimalikult väike ($< 10 \%$ vedeliku lõppmahust, kui võimalik). Teine võimalus on lahustada uuritav aine suuremas mahus katsevees, seda võib käsitleda alternatiivina orgaanilise lahusti kasutamisele.

▼ **M1**

Äärmisel juhul võib lendumatu vähelahustuva aine põhilahuse valmistada lenduvas orgaanilises lahustis, kuid katsesüsteemi lisatava lahusti kogus ei tohi ületada 1 mahuprotsenti ja pärssida mikroorganismide aktiivsust. Lahusti ei tohi mõjutada uuritava aine stabiilsust vees. Lahusti eemaldatakse, kuni lahusesse jääv väga väike lahustikogus enam oluliselt ei suurenda lahustunud orgaanilise süsiniku sisaldust katsevees või -hõljumis. Selle kontrollimiseks tehakse ainespetsiifiline analüüs või, võimaluse korral, lahustunud orgaanilise süsiniku analüüs (6). Lisatava lahusti kogus peab olema võimalikult väike ja uuritav aine peab olema täielikult lahustunud katsevee lõppmahus. Uuritava aine lisamiseks katsendusse võib kasutada ka teisi publikatsioonides (7, 8) kirjeldatud võtteid. Kui uuritava aine lisamiseks kasutatakse orgaanilist lahustit, tuleb lahusti mõju kontrolliks ette nähtud katseveega nõu (mis ei sisalda lisatud aineid) ja katseveega nõu, mis sisaldab lisatud standardainet, käidelda samal viisil kui tegelikku katsendõu, millesse on lisatud kandelahustis lahustatud uuritava aine. Lahusti mõju kontrollimise eesmärk on standardaine lagunemiskiiruse jälgimisega näidata, et lahusti ei pärsi mikroorganismide populatsiooni.

1.8.8. **Katsetingimused**1.8.8.1. *Katsetemperatuur*

Inkubeerimine toimub (eelistatavalt) valguse juurdepääsuta või hajuvalguses püsival temperatuuril (± 2 °C), milleks võib olla välistemperatuur või standardtemperatuur (20–25 °C). Välistemperatuur võib olla kas tegelik proovi temperatuur proovi võtmisel või proovivõtukoha keskmine temperatuur.

1.8.8.2. *Loksutamine või segamine*

Et tahked osakesed ja mikroorganismid püsiks hõljumis, tuleb katsendõu pidevalt loksutada või segada. Loksutamine või segamine soodustab ka hapniku transporti nõus olevast õhust vedelikku, mis tagab nõutavate aeroobsete tingimuste püsimise. Katsendõud asetatakse plaatloksutile (ligikaudu 100 võnget minutis) või magnetsegajale. Loksutamine või segamine peab olema pidev. Loksutamine või segamine peab olema võimalikult nõrk, kuid tagama homogeense suspensiooni püsimise.

1.8.8.3. *Katse kestus*

Katse kestab tavaliselt kuni 60 ööpäeva, välja arvatud juhul, kui kasutatakse poolpidevat režiimi, milles katsehõljumit perioodiliselt uuendatakse (vt punkt 1.8.6 ja 2. liide). Kui uuritava aine lagunemine algab 60 esimese katsepäeva jooksul, võib portskatset siiski pikendada kuni 90 ööpäevani. Lagunemist kontrollitakse vajaliku aja tagant lahuses oleva ^{14}C jääkaktiivsuse või eraldunud $^{14}\text{CO}_2$ aktiivsuse määramisega (punkt 1.8.9.4) ja/või keemilise analüüsiga (punkt 1.8.9.5). Inkubatsiooniaeg peab olema piisav lagunemisprotsessi hindamiseks. Oleks hea, kui katses laguneks üle 50 % ainest; aeglaselt laguneva aine korral peab lagunema piisavalt palju (tavaliselt üle 20 %) ainet selleks, et hinnata lagunemise kiiruskonstanti.

▼ **M1**

Katsesüsteemis mõõdetakse korduvalt pH-d ja hapnikusisaldust, kui eelnevad samalaadsed katsed samast kohast võetud vee- ja setteproovidega ei ole näidanud, et sellist kontrollimist ei ole vaja. Mõnikord võib vees või settes palju kõrgemas kontsentratsioonis olevate primaarsete substraatide tarbimine põhjustada nii rohket CO₂ eraldumist ja hapnikukulu, et katse jooksul muutuvad oluliselt katsetingimused.

1.8.9. **Katse läbiviimine**1.8.9.1. *Nõude ettevalmistamine pelaagiliseks katseks*

Katsenõudesse pannakse sobiv kogus katsevett, nii et ligikaudu üks kolmandik nõu mahust oleks täidetud ja igas nõus oleks vähemalt 100 ml vett. Kui katse tehakse suure arvu nõudega (ja igal proovivõtuajal võetakse prooviks teatavate katsenõude kogu sisu), on katsevee vajalik maht samuti umbes 100 ml, sest liiga väike proovi maht võib mõjutada ootefaasi pikkust. Uuritav aine lisatakse põhilahusena, nagu on kirjeldatud punktides 1.8.2 ja 1.8.7. Lagunemise kineetika määramiseks ja lagunemise kiiruskonstandi arvutamiseks kasutatakse vähemalt kahte uuritava aine kontsentratsiooni, mille väärtused erinevad 5–10 korda. Mõlemad kontsentratsioonid peavad olema alla 100 µg/l ja eelistatavalt vahemikus 1–10 µg/l.

Katsenõud sulletakse õhu- ja CO₂-kindla korgi või kaanega. ¹⁴C-märgiseta lendumatu uuritava aine korral sobib mittetihe puuvillvatikork, mis hoiab ära saastumise õhu kaudu (vt punkt 1.8.1); seejuures peavad võimalikud peamised lagunemisproduktid olema teadaolevalt lendumatud ning CO₂ määratakse kaudselt (vt 3. liide).

Katsenõusid inkubeeritakse valitud temperatuuril (vt punkt 1.8.8.1). Keemiliseks analüüsiks või ¹⁴C mõõtmisteks võetakse proovid katse alguses (enne biolagunemise algust; vt punkt 1.7.1) ja seejärel katse jooksul sobiva aja tagant. Proovivõtt seisneb kas igast paralleelnõust osaproovide võtmises (5 ml alikvoodid) või igal proovivõtuajal kogu katsenõu sisu ärakasutamises. Uuritava aine mineraliseerumist võib määrata kas kaudselt või otse (vt 3. liide). Kiiruskonstandi usaldusväärse hinnangu saamiseks on tavaliselt vaja lagunemisfaasi jooksul (pärast ootefaasi lõppu) võtta proovid vähemalt viie andmepunkti jaoks; kiiresti laguneva aine korral võib piirduda kolme punktiga, kui saab tõendada, et neist piisab. Kui uuritav aine ei lagune kiiresti, on lagunemisfaasi ajal kerge teha ka rohkem mõõtmisi, sellepärast tuleks kineetilise konstandi hindamiseks kasutada rohkem andmepunkte. Kuna biolagunemise kiirused on erinevad, ei saa kindlat proovivõtu ajagraafikut ette anda; aeglase lagunemise korral soovitatakse siiski võtta proove üks kord nädalas. Kui uuritav aine on kiiresti biolagundatav, tuleb kolmel esimesel katsepäeval võtta proov iga päev ja seejärel igal teisel või kolmandal päeval. Mõnikord, näiteks kui aine hüdrolüüsib väga kiiresti, võib olla vaja võtta proove iga tunni tagant. Enne katset soovitatakse teha eeluring sobivate proovivõtuaegade kindlaksmääramiseks. Kui proove on vaja ka edasisteks keemilisteks analüüsideks, on soovitatav võtta rohkem proove ja seejärel valida katse lõpus analüüsivad proovid tagurpidises järjekorras, st viimaseid proove analüüsitakse esimestena (proovide stabiilsuse tagamise kohta säilitamise ajal vt punkt 1.8.9.5, teine lõik).

▼ **M1**1.8.9.2. *Katsenõude ja proovide arv*

Valmistatakse ette piisav arv katsenõusid, et oleksid:

- katsenõud: vähemalt kaks (parem kolm) paralleelnõu igal uuritava aine kontsentratsioonil või (kui prooviks võetakse teatavate katsenõude kogu sisu) suur arv katsenõusid igal kontsentratsioonil (nõu tähis on F_T);
- katsenõud massibilansi arvutamiseks: vähemalt kaks paralleelnõu igal uuritava aine kontsentratsioonil (nõu tähis on F_M);
- ilma uuritava aineta pimekatsenõu: vähemalt üks ainult katseveet sisaldav pimekatsenõu (nõu tähis on F_B);
- standardainega kontrollnõud: kaks paralleelnõu standardainega (nt aniliin või naatriumbensoaat, 10 µg/l) (nõu tähis on F_C). Standardainega kontrollnõusid on vaja minimaalse mikroorganismide aktiivsuse olemasolu kinnitamiseks. Kui see on otstarbekohane, võib radiomärgisega standardainet kasutada ka siis, kui uuritava aine lagunemist jälgitakse keemilise analüüsiga;
- steriilsed kontrollnõud: üks või kaks steriliseeritud katseveega nõu, et kontrollida uuritava aine võimalikku abiootilist lagunemist või muud mittebioloogilist kadu (nõu tähis on F_S). Bioloogilise aktiivsuse võib kõrvaldada katsevee autoklaavimise (121 °C, 20 minutit), mürgi lisamise (nt naatriumasiid (NaN_3), 10–20 g/l, elavhõbe(II)kloriid, HgCl_2 , 100 mg/l, või formaliin, 100 mg/l) või gammakiirguse abil. Kui kasutatakse HgCl_2 , tuleb katsete jäätmel kõrvaldada mürgiste jäätmete eeskirjade kohaselt. Kui veele on lisatud rohkesti setet, on steriilsust raske saavutada; sellisel juhul soovitatakse näiteks kolmekordset autoklaavimist. Tuleb arvestada, et autoklaavimine võib mõjutada sette sorptsioonimadusi.
- lahusti kontrollnõud, milles on katsevesi ja katsevesi standardainega: kaks paralleelnõu, mille sisule on lisatud lahustit samas koguses ja samal viisil kui uuritava aine lisamisel. Neid nõusid on vaja, et standardaine lagunemise määramisega kontrollida lahusti võimalikku kahjulikku mõju.

Katse planeerimisel peab uurija arvestama, et parem on teha rohkem paralleelkatseid kui suurendada proovivõtukordade arvu. Vajalike nõude täpne arv oleneb lagunemise mõõtmise meetodist (vt punkt 1.8.9.1, kolmas lõik; punkt 1.8.9.4 ja 3. liide).

▼ **M1**

Igal proovivõtualal võetakse igast katsenõust kaks osaproovi (nt 5 ml alikvoodid). Kui kasutatakse suurt arvu nõusid ja prooviks võetakse katsenõu kogu sisu, moodustatakse iga proov vähemalt kahe nõu sisust (vt punkt 1.8.9.1, esimene lõige).

1.8.9.3. *Nõude ettevalmistamine hõljumikatseks (mittekohustuslik)*

Katsenõudesse lisatakse nõutav maht katseveett ja vajaduse korral setet (vt punkt 1.8.5). Hõljumikatse nõud valmistatakse ette samal viisil kui pelaagilise katse nõud (vt punktid 1.8.9.1 ja 1.8.9.2). Parem on kasutada seerumipudeleid või samalaadse kujuga nõusid. Suletud nõud asetatakse loksutile horisontaalselt. ^{14}C -märgiseta lendumatu uuritava ainega avatud nõud pannakse muidugi püstasendisse; sel juhul soovitatakse kasutada magnetsegajat ja klaasiga kaetud magnetilisi segamispulkasid. Vajaduse korral aereeritakse pudeleid nõuete kohase õhustatuse tagamiseks.

1.8.9.4. *Radiokeemiline määramine*

Eraldunud $^{14}\text{CO}_2$ mõõdetakse kaudselt ja otse (vt 3. liide). $^{14}\text{CO}_2$ kaudseks määramiseks kasutatakse järgmist vahet: katsevees või -hõljumis leiduva ^{14}C algaktiivsusest lahutatakse summaarne jääkaktiivsus proovivõtuhetkel, mis mõõdetakse pärast proovi pH viimist väärtuseni 2–3 ja CO_2 eemaldamist. Kuna anorgaaniline süsinik eemaldatakse, pärineb mõõdetav jääkaktiivsus üksnes orgaanilisest materjalist. Kaudset $^{14}\text{CO}_2$ määramist ei kasutata, kui uuritava aine olulised muundumissaadused on lenduvad (vt 3. liide). Võimaluse korral tuleb igal proovivõtul mõõta otse vähemalt ühest katsenõust eralduv $^{14}\text{CO}_2$ (vt 3. liide); see meetod võimaldab kontrollida nii massibilansi kui ka biolagunemist, kuid seda saab rakendada ainult suletud nõus tehtava katse korral.

Katse jooksul eraldunud $^{14}\text{CO}_2$ otseseks mõõtmiseks valmistatakse katseks ette rohkem nõusid. Otsest $^{14}\text{CO}_2$ määramist soovitatakse siis, kui uuritava aine olulised muundumissaadused on lenduvad. Iga andmepunkti saamiseks viiakse katsenõu sisu pH väärtuseni 2–3 ja $^{14}\text{CO}_2$ kogutakse sise- või välisabsorberisse (vt 3. liide).

^{14}C -märgisega uuritava aine ja oluliste muundumissaaduste kontsentratsioonid võib määrata kas radiokromatograafiliselt (õhukese kihi kromatograafia, radioloogiline õhukese kihi kromatograafia) või radiokeemilise detektsiooniga kõrgefektiivse vedelikromatograafia abil.

Soovi korral võib määrata ka, kuidas on faaside vahel jaotunud jääkradioaktiivsus (vt 1. liide), lagunemata uuritav aine ja muundumissaadused.

▼ M1

Massibilansi kontrollimiseks mõõdetakse katse lõpus otseselt $^{14}\text{CO}_2$, kasutades selleks eraldi katsenõu, millest ei ole katse käigus proove võetud (vt 3. liide).

1.8.9.5. Keemiline analüüs

Tundliku analüüsimeetodi olemasolu korral võib esmase biolagunemise hindamiseks kasutada radioaktiivse märgistamise asemel uuritava aine jääkkontsentratsiooni mõõtmist. Kui mineraliseerumise ulatuse mõõtmiseks kasutatakse radiomärgisega ainet, võib paralleelselt teha ka keemilise analüüsi, mis võimaldab saada lisateavet ja kontrollida meetodit. Keemilist analüüsi võib kasutada ka uuritava aine lagunemise käigus tekkinud muundumissaaduste mõõtmiseks, seda soovitatakse ainete puhul, mille mineraliseerumise poolestusaeg on üle 60 ööpäeva. Igal proovivõtukorral mõõdetakse ning registreeritakse (absoluutsetes ühikutes ja protsendina algsisaldusest) uuritava aine ja muundumissaaduste kontsentratsioonid. Üldiselt tuleb identifitseerida iga muundumissaadus, mille sisaldus teataval proovivõtukorral on $\geq 10\%$ uuritava aine algkontsentratsioonist; identifitseerimata jätmine peab olema mõistlikult põhjendatud. Kui teatava muundumissaaduse kontsentratsioon katse jooksul pidevalt kasvab, võib see osutada selle saaduse püsivusele; sellepärast tuleb kaaluda sellise saaduse identifitseerimist ka siis, kui selle kontsentratsioon ei ületa eespool märgitud piirmäära. Kui uuritav aine võib kiiresti abiootiliselt muunduda (nt hüdrolüüsuda), tuleb kaaluda muundumissaaduste analüüsimist steriilsete kontrollkatsete abil. Muundumissaaduste identifitseerimise ja sisalduse mõõtmise vajadust kaalutakse iga juhtumi puhul eraldi ja põhjendatakse katseprotokollis. Orgaanilise lahustiga ekstraheerimist rakendatakse asjaomase analüüsimeetodi juhiste kohaselt.

Kui analüüs toimub hiljemalt 24 tundi pärast proovi võtmist, hoitakse proovi õhukindlas nõus 2–4 °C juures (eelistatav). Pikemaks säilitamiseks külmutatakse proov temperatuurini alla –18 °C või konserveeritakse keemiliselt. Proovi konserveerimiseks ei soovitata hapestamist, sest hapestatud proov võib olla ebapüsiv. Kui proovi ei analüüsita 24 tunni jooksul ja seda on vaja kauem säilitada, tuleb teha säilivusuuring ja tõendada, et uuritavad keemilised ained on temperatuuril alla –18 °C või konserveeritult säilitamisel stabiilsed. Kui asjaomane analüüsimeetod hõlmab ekstraheerimist lahustiga või tahkefaas-ekstraheerimist, tuleb aine ekstraheerida kohe pärast proovi võtmist või pärast proovi säilitamist külmutatult kuni 24 tundi.

Analüüsimeetodi tundlikkusest olenevalt võib olla vaja võtta suuremaid proove, kui on märgitud punktis 1.8.1. Katset on kerge teha 2–3-liitristes nõudes: igasse nõusse pannakse 1 liiter katseveti ja võetakse umbes 100-milliliitriseid proove.

▼ **M1**2. **KATSEANDMED JA NENDE ESITAMINE**2.1. **ANDMETE TÖÖTLEMINE**2.1.1. **Andmete graafiline esitamine**

Proovivõtuajad ümardatakse täistundideks (välja arvatud juhul, kui aine laguneb oluliselt minutite või tundide jooksul), mitte täisööpäevadeks. Uuritava aine jääkaktiivsuse (^{14}C -märgisega aine) või jääkkontsentratsiooni (märgistamata aine) hinnatud väärtused esitatakse sõltuvalt ajast graafiliselt nii lineaarses kui ka poollogaritmilises skaalas (vt joonised 1a ja 1b). Kui on toimunud lagunemine, võrreldakse nõudega F_T saadud tulemusi nendega, mis on saadud nõudega F_S . Kui uuritava ainega nõude (F_T) puhul saadud tulemuste keskvärtus erineb steriilsete nõudega (F_S) saadud keskvärtusest vähem kui 10 %, võib oletada, et täheldatud lagunemine on valdavalt abiootiline. Kui lagunemise määra nõudes F_S on väiksem, siis võib neid andmeid kasutada nõudes F_T toimunud biolagunemise määra hindamisel parandina (vastav arv lahutatakse). Kui tehakse mittekoostuslik oluliste muundumissaaduste analüüs, esitatakse lisaks uuritava aine vähenemise graafikule ka muundumissaaduste tekkimist ja kadumist kajastavad graafikud.

Ootefaasi kestuse t_L hindamiseks ekstrapoleeritakse lagunemiskõvera (poollogaritmilise graafiku) lineaarne osa null-lagunemise tasemeni või määratakse ligikaudu 10 % lagunemise aeg (vt joonised 1a ja 1b). Poollogaritmiliselt graafikult leitakse esimest järku kiiruskonstandi k ja selle standardhälbe hinnang, kasutades lineaarset regressiooni \ln (^{14}C jääkaktiivsus või uuritava aine jääkkontsentratsioon) vs. aeg. Eriti ^{14}C mõõtmise puhul tuleb kasutada ainult neid andmeid, mis kuuluvad ootefaasile järgnevasse lagunemiskõvera esimesse lineaarsesse osasse; paljude suure määramatusega andmete asemel on parem koguda väiksem arv representatiivseid andmeid. Antud juhul hõlmab määramatus vigu, mis on seotud mõõdetud ^{14}C jääkaktiivsuse soovitatud otsese kasutamisega (vt edaspidi). Kui lagunemine on kahefaasiline, on mõnikord vaja arvutada kaks kiiruskonstanti. Selleks määratakse kindlaks lagunemiskõvera kaks faasi. Kui ühest ja samast nõust võetakse osaproove, arvutatakse kiiruskonstant k ja poolestusaeg $t_{1/2} = \ln 2/k$ iga paralleelnõu jaoks eraldi; kui igal proovivõtukorral võetakse prooviks katsenõu kogu sisu, arvutatakse need parameetrid keskvärtuste alusel (vt punkt 1.8.9.2, viimane lõik). Esimese meetodi korral esitatakse iga paralleelnõu jaoks leitud kiiruskonstant ja poolestusaeg ning nende keskvärtused koos standardhälvetega. Uuritava aine kõrge kontsentratsiooni puhul võib lagunemiskõver (poollogaritmiline graafik) sirgjoonest märkimisväärselt kõrvale kalduda ja esimest järku kinetika ei kehti. Sel juhul ei ole poolestusaja määramisel mõtet. Piiratud andmevahemikus saab siiski rakendada pseudo-esimest järku kinetikat ja määrata poollagunemisaeg DT_{50} (aeg, mille jooksul laguneb 50 % ainest). Ent tuleb silmas pida, et DT_{50} abil ei saa ennustada lagunemise ajalist kulgu väljaspool valitud andmevahemikku, sest DT_{50} iseloomustab ainult valitud andmekogumit. Kuna statistilisi arvutusi ja kõverate lähendamist hõlbustavad analüüsiprogrammid on kergesti kättesaadavad, on soovitatav kasutada asjaomast tarkvara.

▼ **M1**

Kui kasutatakse keemilist analüüsi, määratakse esmase lagunemise kiiruskonstant ja poolestusaeg samal viisil, nagu kirjeldati eespool mineraliseerumise üldmäära mõõtmise puhul. Kui esmane lagunemine on limiteeriv protsess, võib mõnikord kasutada ka lagunemise üldmäära iseloomustavaid andmepunkte. Seda võib teha, kuna ^{14}C aktiivsuse mõõtmisest erinevalt on antud juhul otsene mõõtmine.

Kui kasutatakse ^{14}C -märgisega ainet, koostatakse vähemalt katse lõpus massibilanss, mis väljendatakse lisatud aine algkontsentratsiooni protsentides.

2.1.2. **Jääkaktiivsus**

Orgaanilise aine ^{14}C -märgisega osa lagunemisel läheb suurem osa isotoobist ^{14}C üle $^{14}\text{CO}_2$ -ks; muu osa kasutatakse biomassi kasvatamiseks ja/või rakuväliste ainevahetussaaduste sünteesimiseks. Järelikult ei muundu aine täielikult „lõplikul“ biolagunemisel kogu tema süsinik $^{14}\text{CO}_2$ -ks. Biosünteesi produktidesse seotud ^{14}C vabaneb aeglaselt $^{14}\text{CO}_2$ -na hiljem toimuval teisel mineraliseerumisel. Graafikutel, mis kajastavad orgaanilise ^{14}C jääkaktiivsuse (mõõdetakse pärast CO_2 eemaldamist) või eraldunud $^{14}\text{CO}_2$ aktiivsuse sõltuvust ajast, esineb sellepärast pärast lagunemise lõppu järelfaas. See raskendab andmete kineetilist tõlgendamist ja sellepärast kasutatakse lagunemise kiiruskonstandi määramiseks tavaliselt ainult kõvera esimest osa, mis järgneb ootefaasile ja lõpeb enne, kui on lagunenu ümber 50 % ainest. Kui uuritav aine laguneb, on orgaanilise ^{14}C üldine jääkaktiivsus alati suurem kui lagunemata uuritava ainega seotud ^{14}C aktiivsus. Kui uuritava aine lagunemine on esimest järku reaktsioon ja CO_2 -ni mineraliseerub konstantne osa α , on ^{14}C kadumise kõvera (summaarne orgaaniline ^{14}C vs. aeg) algõõs võrdne α ja uuritava aine (täpsemalt, uuritava aine ^{14}C -märgisega osa) kontsentratsiooni kajastava kõvera tõusu korrutisega. Järelikult, kui kasutatakse orgaanilise ^{14}C summaarse aktiivsuse mõõtmise tulemusi ilma parandusteta, on arvatud lagunemise kiiruskonstant tegelikult väiksem. Mitmesugustel lihtsustavatel eeldustel põhinevaid meetodeid, kuidas mõõdetud radiokeemilise aktiivsuse järgi hinnata uuritava aine kontsentratsiooni, on kirjeldatud reas publikatsioonides (2, 9, 10, 11). Neid meetodeid on kõige lihtsam kasutada kiiresti lagundatavate ainete puhul.

2.2. **TULEMUSTE TÕLGENDAMINE**

Kui selgub, et k ei olene lisatud aine kontsentratsioonist (st uuritava aine eri kontsentratsioonidel arvutatakse enam-vähem ühesugused k väärtused), siis võib järeldada, et see esimest järku kiiruskonstant tõesti kirjeldab seda reaktsiooni kasutatud katsetingimustes (uuritav aine, veeproov, katsetemperatuur). Kui võrd saadud tulemust võib üldistada või ekstrapoleerida muudele süsteemidele, tuleb selgitada eksperdi hinnangu. Kui kasutatakse uuritava aine kõrget kontsentratsiooni ja lagunemine ei järgi esimest järku kineetikat, ei saa katseandmeid kasutada esimest järku kiiruskonstandi või vastava poolestusaja otseseks määramiseks. Uuritava aine kõrgel kontsentratsioonil saadud katseandmeid võib siiski kasutada mineraliseerumise üldmäära hindamiseks ja/või muundumissaaduste identifitseerimiseks ja kvantitatiivseks kirjeldamiseks.

▼ **M1**

Kui on teada, millise kiirusega toimuvad teised aine kadu põhjustavad protsessid peale biolagunemise (nt hüdroolüüs või lendumine), võib biolagunemise ligikaudse kiiruse hindamisel lahutada need kiirused katses mõõdetud üldkiirusest. Andmeid hüdroolüüsi kohta võib saada näiteks steriilsest kontrollkatsest või kõrgemal uuritava aine kontsentratsioonil tehtud paralleelkatsest.

$^{14}\text{CO}_2$ kaudset ja otsest määramist (punkt 1.8.9.4 ja 3. liide) võib kasutada ainult selleks, et mõõta uuritava aine mineraliseerumist CO_2 -ni. ^{14}C -märgisega uuritava aine kontsentratsiooni ja oluliste muundumissaaduste tekke analüütiliseks määramiseks võib kasutada radiokromatograafiat (radioloogilist õhukese kihi kromatograafiat) või kõrgefektiivset vedelikkromatograafiat (punkt 1.8.9.4, kolmas lõik). Poolestusaega saab otse määrata juhul, kui lagunemisel ei teki olulisi muundumissaadusi (definiitsiooni kohaselt loetakse oluliseks muundumissaaduseks ainet, mille kontsentratsioon on vähemalt 10 % uuritava aine algkontsentratsioonist). Kui sellised olulised muundumissaadused siiski tekivad, tuleb andmeid üksikasjalikult hinnata. Selleks võib olla vaja muundumissaadusi korduvalt määrata ja/või identifitseerida (vt punkt 1.8.9.5, esimene lõik), välja arvatud juhul, kui muundumissaaduste edasist käitumist saab kogemuste (nt lagunemisteed käsitlevate andmete) alusel põhjendatult hinnata. Kuna see, millises ulatuses uuritava aine süsinik muundub CO_2 -ks, sõltub oluliselt uuritava aine ja muude substraatide kontsentratsioonist, katsetingimustest ja mikroobikooslusest, ei saa kõnesoleva katsega, erinevalt lahustunud orgaanilise süsiniku kao mõõtmisest, otse määrata lõplikku biolagunemist, kuid tulemus on respiromeetrilise katse tulemusega sarnane. Mineraliseerumise määr on järelikult lõpliku biolagunemise minimaalsest tasemest väiksem või sellega võrdne. Täielikuma pildi saamiseks lõplikust biolagunemisest (mineraliseerumine ja sidumine biomassi) tehakse katse lõpus ^{14}C faasi- jaotuse analüüs (vt 1. liide). Tahkete osakeste puuli seotud ^{14}C jaguneb baktermassi seotud ^{14}C -ks ja orgaanilistele tahketele osakestele sorbeerunud ^{14}C -ks.

2.3. KATSE VASTAVUS NÕUETELE

Kui standardaine ei lagune eeldatud aja jooksul (aniliini ja naatriumbensoadi eeldatav lagunemisaeg on tavaliselt alla kahe nädala), on katse nõuetelevastavus kaheldav ja vajab tõendamist; teine võimalus on korrata katset uue veeprooviga. Käesoleva meetodi kontrollimisel seitsme Euroopa labori vahelises ISO võrdluskatses oli aniliini lagunemise kiiruskonstandi väärtus 20 °C juures pärast kohanemisfaasi vahemikus 0,3–1,7 ööpäev⁻¹, keskvärtus 0,8 ööpäev⁻¹ ja standardhälve $\pm 0,4$ ööpäev⁻¹ ($t_{1/2} = 0,9$ ööpäeva). Ootefaas oli tavaliselt 1–7 ööpäeva. Kontrollitud veeproovides registreeriti bakterbiomassi sisalduseks 10^3 – 10^4 kolooniaid moodustavat üksust ühes milliliitris. Toitainerikastes Kesk-Euroopa veeproovides oli lagunemiskiirus suurem kui Põhja-Euroopa oligotroofsetes veeproovides; see võib olla tingitud kas erinevast troofsusest või erinevustest varasemas kokkupuutumises keemiliste ainetega.

Radiomärgisega ainete korral peaks kogu määramissaagis (massibilanss) katse lõpus olema 90–110 %; märgiseta ainete korral peaks algfaasi määramissaagis katse alguses olema 70–110 %. Need saagisevahemikud on esitatud siiski üksnes sihtvahemikena ja neid ei tule kasutada katse nõuetele vastavuse kriteeriumina.

▼ **M1**3. **KATSEPROTOKOLL**

Katseprotokollis märgitakse selgesti, kas tegemist on pelaagilise või hõljumikatsega; lisaks sellele esitatakse vähemalt järgmine teave.

Uuritav aine ja standardaine (standardained):

- uuritava aine ja standardaine tavanimetused, keemilised nimetused (soovitavalt IUPACi ja/või CASi nimetused), CASi numbrid, struktuurivalemid (radiomärgisega aine puhul näidatakse ¹⁴C asukoht) ning olulised füüsikalised-keemilised omadused (vt punktid 1.5 ja 1.6);
- muundumissaaduste identifitseerimise ja mõõtmise standarditena kasutatud ainete keemilised nimetused, CASi numbrid, struktuurivalemid (radiomärgisega aine puhul näidatakse ¹⁴C asukoht) ning olulised füüsikalised-keemilised omadused;
- uuritava aine ja standardaine puhtusaste (lisandid);
- märgisega kemikaalide radiokeemiline puhtusaste ja eriaktiivsus (vajaduse korral).

Pinnavesi:

Võetud veeproovi kohta esitatakse vähemalt järgmised andmed:

- proovivõtukohta asukoht ja kirjeldus, kaasa arvatud saastelugu (võimaluse korral);
- proovivõtu kuupäev ja aeg;
- toitainesisaldus (üldlämmastik, ammoonium, nitritid, nitraadid, üldfosfor, lahustunud ortofosfaat);
- proovivõtu sügavus;
- proovi väline iseloomustus (nt värvus ja hägusus);
- lahustunud ja summaarne orgaaniline süsinik;
- biokeemiline hapnikutarve;
- proovi võtmisel kohapeal määratud temperatuur ja pH;
- hapnikusisaldus või redokspotentsiaal (nõutav, kui ei ole ilmne, et tegemist on aeroobsete tingimustega);
- soolsus või juhtivus (mere- või riimvee puhul);
- hõljumisisaldus (häguse proovi puhul);
- proovivõtu asukohta käsitlev muu asjakohane teave, mis oli teada proovivõtu ajal (nt andmed jõe voolu- või merehoovuse kiiruse kohta proovi võtmise ajal või varem, naabruses esinenud suured heited ja nende laad, proovivõttule eelnenud ilmastikutingimused);

ning järgmised mittekohustuslikud andmed:

- mikroorganismide biomass (nt otse loendatud akridiinoranžiga värvunud rakkude arv või kolooniaid moodustavate üksuste arv);

▼ **M1**

- anorgaaniline süsinik;
- klorofüll a kontsentratsioon, mis on vetikate biomassi kajastav spetsiifiline näitaja.

Hõljumikatse korral esitatakse lisaks veel järgmised andmed sette kohta:

- setteproovi võtmise sügavus;
- sette väline iseloomustus (värvunud, muda-, aleuriit- või liivsete);
- lõimis (jämeteralise liiva, peeneteralise liiva, aleuriidi ja savi protsent);
- hõljuvaine kuivmassi sisaldus, g/l; orgaanilise süsiniku üldsisaldus või põletuskadu, mis on orgaanilise aine sisalduse näitaja;
- pH;
- hapnikusisaldus või redokspotentsiaal (nõutav, kui ei ole ilmne, et tegemist on aeroobsete tingimustega).

Katsetingimused:

- proovivõtust katseni möödunud ajavahemik, proovi hoidmine ja ettevalmistamine, katsekuupäevad;
- lisatud uuritava aine kogus, kontsentratsioon katses ja standardaine;
- uuritava aine lisamise viis, kaasa arvatud lahusti kasutamine;
- kasutatud pinnavee ja sademe maht ning iga proovivõtukorra puhul analüüsitud osaproovi maht;
- kasutatud katsesüsteemi kirjeldus.

Kui katse ei toimunud valguse juurdepääsuta, märgitakse hajuvalgustuse tingimused;

- teave steriilsete kontrollkatsete ettevalmistamise kohta (autoklaavimise temperatuur, aeg ja kordade arv);
- inkubatsioonitemperatuur;
- analüüsimeetodid ja radiokeemilise mõõtmise meetodid, massibilansi kontrollimiseks ja faasijaotuse mõõtmiseks (kui mõõdeti) kasutatud meetodid.
- paralleelkatsete arv.

Tulemused:

- saagis protsentides (vt punkt 1.7.1);
- kasutatud analüüsimeetodite korratavus ja tundlikkus, kaasa arvatud avastamislävi ja mõõtmislävi (vt punkt 1.7.2);

▼ M1

- kõik mõõtmistulemused (koos proovivõtuaegadega) ja arvutatud väärtused esitatakse tabelina ja lagunemiskõverad graafiliselt; iga uuritava kontsentratsiooni ja iga paralleelnõu jaoks esitatakse logaritmilise graafiku tõusu iseloomustav lineaarse korrelatsiooni koefitsient, hinnanguline ootefaasi kestus ning (võimaluse korral) esimest järku või pseudo-esimest järku kiiruskonstant ja vastav poollagunemisaeg (või poolestusaeg, t_{50});
- asjaomased väärtused (ootefaasi kestus, lagunemise kiiruskonstant, poollagunemisaeg või poolestusaeg, t_{50}) esitatakse üksikute paralleelkatsete tulemuste keskmisena;
- lagunemiskõvera laadi ja uuritava aine kontsentratsiooni võimaliku mõju alusel liigitatakse katsesüsteem kohanenud või kohanemata süsteemiks;
- lõpliku massibilansi kontrolli ja faasijaotuse mõõtmiste tulemused;
- mineraliseerunud ^{14}C osa ja esmase lagunemise lõpptase (kui see määrati analüüsiga);
- (vajaduse korral) lisatud ainete ja oluliste muundumissaaduste identifitseerimisandmed, molaarne kontsentratsioon ja protsent (vt punkt 1.8.9.5, esimene lõik);
- oletatav muundumistee (vajaduse korral);
- tulemuste arutelu.

4. KIRJANDUS

- 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 ¹⁴C-labeled chemicals at low concentrations in surface water systems. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 45, 274–283.
- 11) ISO/CD 14592-1 (1999). Ring test report: Water Quality – Evaluation of the aerobic biodegradability of organic compounds at low concentrations part 1 – report of 1998/1999 ring-test. Shake flask batch test with surface water or surface water/sediment suspensions.

▼ **M1**

1. liide

¹⁴C jaotus faaside vahel

Lisaks tavalistele orgaanilise ¹⁴C jääkaktiivsuse mõõtmistele määratakse meetodi kontrollimiseks ka massibilanss, mille puhul mõõdetakse eraldunud ¹⁴CO₂ otse pärast selle püüdmist absorberisse (vt 3. liide). ¹⁴CO₂ eraldumine on biolagunemise otsene tõend, kuna abiootilisel lagunemisel või muude kaomehhanismide, nagu lendumise või sorptsiooni korral seda ei esine. Kasulikku lisateavet biolagunemise kohta annab mõõtmine, kuidas summaarne orgaaniline süsinik on jaotunud lahusefaasi (lahustunud orgaanilise ¹⁴C aktiivsus) ja osakeste faasi (tahkete osakestega seotud orgaanilise ¹⁴C aktiivsus) vahel; tahked osakesed eraldatakse membraanfiltrimise või tsentrifuugimisega. Tahkete osakestega seotud orgaanilise ¹⁴C aktiivsusesse annavad panuse mikroobide biomassile ja muudele tahketele osakestele sorbeerunud uuritav aine ja uuritavast ainest pärinev süsinik, mida on kasutatud uue rakumaterjali sünteesiks ja seotud tahkete osakestena esineva biomassi fraktsiooni. Lahustunud orgaaniline ¹⁴C määratakse biolagunemise lõpus (köveral lagunemine vs. aeg esineva platoo järgi).

Et valitud proovis määrata ¹⁴C jääkaktiivsuse jaotus faaside vahel, filtritakse proov läbi membraanfiltrit poori suurusega 0,22 või 0,45 µm, mis on valmistatud uuritavat ainet praktiliselt mitteadsorbeerivast materjalist (võib sobida polükarbonaatfilter). Kui uuritava aine sorptsioon filtrile (kontrollitakse enne katset) on nii tugev, et seda ei saa jätta arvestamata, võib filtrimise asemel kasutada suure kiirendusega tsentrifuugimist (2 000 g; 10 min).

Filtraati või tsentrifugaati käideldakse 3. liites filtrimata proovi puhul kirjeldatud viisil. Membraanfilter lahustatakse sobivas stsintillatsioonivedelikus ja aktiivsus loendatakse tavalisel viisil, kusjuures kasutatakse kas ainult välisstandardi suhte meetodil saadud kustumisparandit või proovi oksüdeerijat. Tsentrifugimise korral resuspendeeritakse tahkete osakeste sade 1–2 ml destilleeritud vees ja asetatakse stsintillatsioonipudelisse. Tsentrifugitopsi pestakse kaks korda 1 ml destilleeritud veega ja pesuveed lisatakse stsintillatsioonipudelisse. Vajaduse korral võib hõljumi fikseerida vedelikstsintillatsiooniloendamiseks ettenähtud geeli.

▼ **M1**

2. liide

Poolpidev meetod

Raskesti lagunevate ainete piisavaks lagundamiseks võib olla vajalik kuudepikkune inkubeerimine. Kui esmase veeproovi omaduste säilitamiseks katsehõljumit ei uuendata, ei peaks katse kestus ületama tavaliselt 60 ööpäeva. Kui uuritava aine lagunemine algab esimese 60 ööpäeva jooksul, võib katset siiski pikendada kuni 90 ööpäevani katsehõljumit uuendamata.

Mitmesuguste kaomehhanismide ning veeproovis leiduvate asendamatute toitainete ja esmaste süsiniksubstraatide ammendumise tõttu võib pika inkubatsiooniaja jooksul väheneda mikroobikoosluse mitmekesisus. Sellepärast soovitatakse aeglaselt lagunevate ainete lagunemiskiiruse nõuetekohaseks määramiseks kasutada poolpidevat katset. Kui kogemuste põhjal võib eeldada, et 20 % aine lagunemiseks on proovi vaja inkubeerida kolm kuud, tuleb katset alustada poolpidevas režiimis. Kui katset on alustatud portsrežiimis ja umbes 60 ööpäevaga ei ole nõutavat lagunemise määra saavutatud, võib hariliku portsrežiimi asendada poolpideva režiimiga. Kui on registreeritud oluline lagunemine (> 20 %), võib poolpideva režiimi peatada ja jätkata katset portsrežiimis.

Poolpideva katse puhul vahetatakse iga kahe nädala tagant umbes üks kolmandik katsehõljumi mahust värskest võetud veega, millele on lisatud uuritavat ainet algkontsentratsioonini. Ka mittekoostusliku hõljumikatse korral lisatakse vahetusveele setet algkontsentratsioonini (0,01–1 g/l). Hõljumikatse puhul on oluline, et ka veevahetuse jooksul säiliks täielikult suspendeeritud süsteem ning tahke aine ja vee viibeajad oleksid samad, vastasel juhul läheks kaduma taotletud sarnasus homogeense, fikseeritud faasideta veesüsteemiga. Sellepärast tuleks poolpideva režiimi kasutamisel valida suspendeeritud sette kontsentratsioon pigem selle vahemiku madalamas osas.

Uuritava aine lisamine ettenähtud viisil tähendab, et katsesuspensiooni osalisel uuendamisel ei ületata uuritava aine algkontsentratsiooni ja järelikult välditakse kõrge uuritava aine kontsentratsiooni puhul sageli esinevat kohanemisfaasi. Kuna katse käigus toimub nii reinokuleerimine kui ka ammendatud toitainete ja esmaste substraadivarude täiendamine, taastatakse algne mikroobikoosluse mitmekesisus ja katset võib põhimõtteliselt pikendada lõpmatult. Poolpideva režiimi kasutamisel on oluline silmas pidada, et uuritava aine jääkkontsentratsioonis tuleb teha parandid, mis arvestavad iga veevahetusega lisatud ja eemaldatud uuritava aine koguseid. Vähesorbeeruva aine puhul ei ole vaja teha vahet lahustunud uuritava aine kontsentratsiooni ja uuritava aine üldkontsentratsiooni vahel. Ainete puhul, mille $\log K_{ow} < 3$ (ja tegemist on neutraalse lipofiilse ühendiga), on ettenähtud tingimustes (tahke aine sisaldus 0,1–1 g/l) sorptsioon tähtsusetu (< 5 %). Seda selgitab järgmine arvutusnäide. Tahke aine sisaldus 0,1 g/l vastab süsiniku sisaldusele ligikaudu 10 mg/l (süsiniku osa, $f_c = 0,01$). Eeldame, et

uuritava aine $\log K_{ow} = 3$,

$$K_{oc} = 0,42 \times K_{ow},$$

$$\text{jaotuskoeffitsient } K_d = f_c \times K_{oc},$$

järelikult avaldub üldkontsentratsiooni lahustunud fraktsioon (C-vesi (C_w)/C-üld (C_t)) järgmiselt:

$$C_w/C_t = 1/(1 + K_d \times SS) = 1/(1 + K_{oc} \times f_c \times SS) = 1/(1 + 0,42 \times 10^3 \times 0,01 \times 0,1 \times 10^{-3}) = 0,999.$$

▼ **M1**

3. liide

¹⁴CO₂ määramine**¹⁴CO₂ kaudne määramine**

Kui uuritav aine ei ole lenduv ega muundu lenduvateks muundumissaadusteks, on standardsete mõõtmiste korral kaudne meetod tavaliselt kõige väiksemat ajakulu nõudev ja kõige täpsem. Filtrimata 5-milliliitrised proovid pannakse lihtsalt stsintillatsioonipudelitesse. Sobiv proovi algaktiivsus on 5 000 – 10 000 lagunemist minutis (80–170 Bq) ja minimaalne algaktiivsus umbes 1 000 lagunemist minutis. Pärast 1–2 tilga kontsentreeritud H₃PO₄ või HCl lisamist keskonna hapestamiseks pH-ni 2–3 eraldatakse CO₂. CO₂ eraldamiseks võib barboteerida õhku läbi proovi ligikaudu ½–1 tunni jooksul. Teine võimalus CO₂ eraldamiseks on loksutada proovi tugevasti 1–2 tundi (mikroplaatloksutil) või loksutada mõõdukalt hommikuni. CO₂ eraldumise täielikkust on vaja kontrollida (selleks pikendatakse barboteerimise või loksutamise aega). Seejärel lisatakse veeproovide puhul loendamiseks sobiv stsintillatsioonivedelik, proov homogeniseeritakse keerisregistil ja määratakse radioaktiivsus vedelikstsintillatsiooniloenduse abil, millest lahutatakse pimekatses leitud taustaktiivsus (F_B). Kui katsevesi ei ole väga tugevasti värvunud ja tahkete osakeste sisaldus ei ole ülemäära suur, on kustumine kõigi proovide puhul tavaliselt ühetaoline ja piisab välisstandardi abil leitud kustumisparandist. Kui katsevesi on tugevasti värvunud, võib kustumisparandi leidmiseks olla vajalik sisestandardi lisamine. Suure tahkete osakeste sisalduse korral võib homogeense lahuse või geeli saamine olla võimatu või kustumine võib erinevates proovides olla väga erinev. Sellisel juhul võib kasutada järgmist suspensioonide uurimiseks mõeldud loendusmeetodit. ¹⁴CO₂ kaudselt mõõtmiseks hõljumikatses eraldatakse faasid, tsentrifuugides 10 ml katsevee/katsehõljumi homogeenset proovi sobival kiirendusel (40 000 m/s², 15 minutit). Veefaasi käideldakse eespool kirjeldatud viisil. ¹⁴C aktiivsuse määramiseks tahkete osakeste faasis (tahkete osakestega seotud orgaanilise ¹⁴CO₂ aktiivsus) resuspendeeritakse sade väikeses koguses destilleeritud vees, kantakse suspensioon üle stsintillatsioonipudelitesse ja lisatakse geeli moodustav stsintillatsioonivedelik (selleks on müügil spetsiaalsed stsintillatsioonivedelikud). Olenevalt tahkete osakeste laadist (nt orgaanilise aine sisaldusest) võib proovi digereerida koosolubilisatoriga hommikuni, homogeniseerida keerisregistil ja lisada seejärel stsintillatsioonivedelik. Tahkete osakestega seotud orgaanilise ¹⁴CO₂ aktiivsuse määramiseks võib sademe ka põletada hapniku liias proovi oksüdeerija juuresolekul. Sellisel juhul tuleb alati kasutada sisestandardit, kusjuures kustumisparandite arvestamiseks võib olla vaja lisada sisestandard igale proovile eraldi.

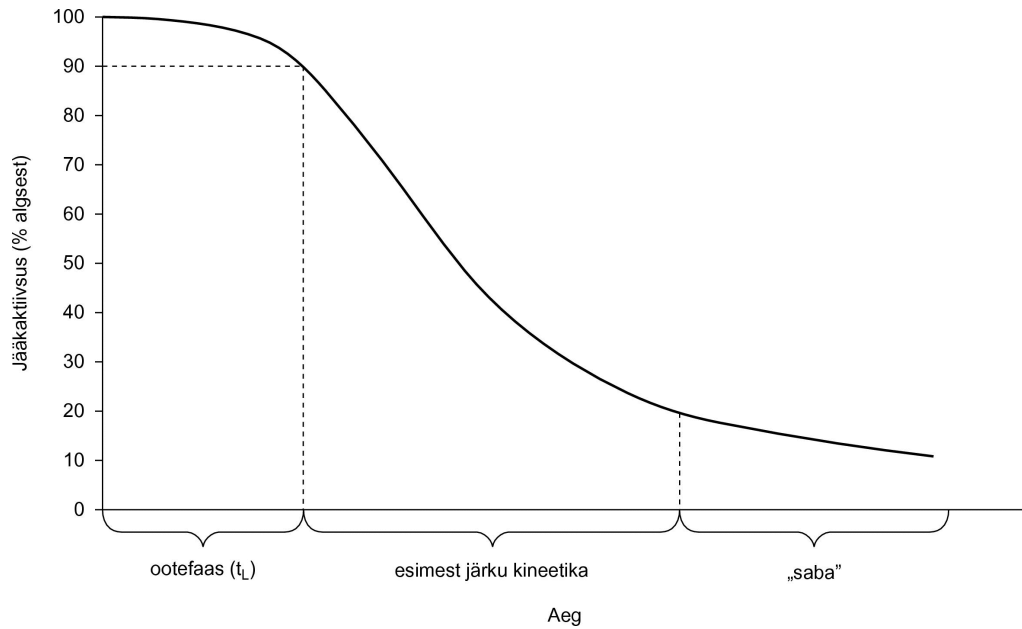
¹⁴CO₂ otsemääramine

Kui eraldunud ¹⁴CO₂ määratakse otse, tuleb katseks ette valmistada rohkem nõusid ja võtta iga mõõtepunkti puhul prooviks ühe katsenõu kogu sisu, hapestada see pH-ni 2–3 ja koguda ¹⁴CO₂ siseabsorberisse (pannakse igasse katsenõusse katse alguses) või välisabsorberisse. Absorbeeriva keskkonnana võib kasutada leelist (1 N NaOH lahus või NaOH graanulid), etanoolamiini või mõnda etanoolamiini baasil valmistatud müügil olevat absorbenti. ¹⁴CO₂ otsemõõtmise korral peavad katsenõud olema suletud butüülkummist septumitega.

▼ **M1**

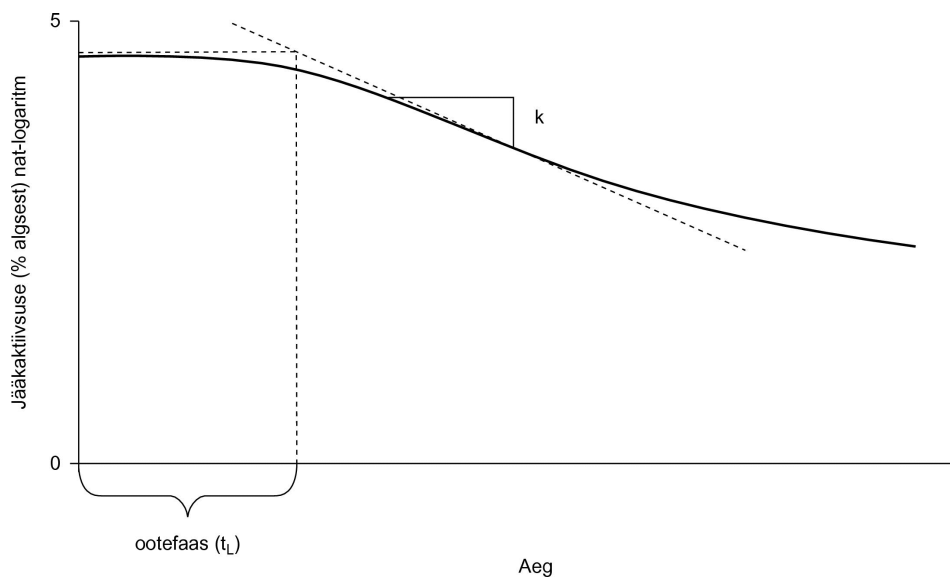
Joonis 1a

Naturaalses teljestikus (jäakaktiivsus vs. aeg) esitatud katseandmete näide



Joonis 1b

Poollogaritmilises teljestikus (naturaallogaritm jäakaktiivsusest vs. aeg) esitatud katseandmete näide



▼ **M1**C.26. **LEMLE *LEMNA* SP. KASVU PIDURDAMISE KATSE**1. **METOODIKA**

Käesolev metoodika on samaväärne standardiga OECD TG 221 (2006) (1). ELi asutuste hulgas on jõutud laialdasele kokkuleppele, et intensiivse värvusega ühendite puhul on lemle kasvu pidurdamise katse sobiv asendusmeetod vetikal põhinevale katsele (2, 3).

1.1. **SISSEJUHATUS**

Käesolev metoodika on ette nähtud ainete mürgise mõju hindamiseks lemmedel, perekonda *Lemna* kuuluvatel mageveetaimedel. See põhineb senistel juhenditel (4, 5, 6, 7, 8, 9), kuid neisse on tehtud muudatusi, mis kajastavad viimaste uuringute ja rea põhiküsimuste üle peetud nõupidamiste tulemusi. Soovitav meetod on valideeritud rahvusvahelise laboratooriumidevahelise võrdluskatse abil (10).

Käesolevas metoodikas kirjeldatakse mürgisuse kontrollimist küürlemlel (*Lemna gibba*) ja väikesel lemlel (*Lemna minor*), mida on ulatuslikult uuritud ja mis on eespool viidatud standardite kohased katseobjektid. Suure fenotüübilise varieeruvuse tõttu on lemle liikide (*Lemna* spp.) taksonoomia keeruline. Kuigi lemle tundlikkuses mürgiste ainete suhtes võib esineda geneetilist varieeruvust, on andmeid selle varieeruvusallika kohta praegu liiga vähe selleks, et soovitada käesolevas metoodikas kasutamiseks mõnda konkreetset kloon. Tuleb märkida, et katset ei tehta puhaskultuuriga, kuid teatavatel katsetappidel rakendatakse meetmeid, et saastumine muude organismidega oleks minimaalne.

Kirjeldatakse katse üksikasju uuendatava katselahuse (poolstaatilise ja läbivoolukatse) ning mitteuuendatava katselahuse (staatilise katse) korral. Olenevalt katsete eesmärgist ja eeskirjadest soovitatakse kaaluda poolstaatilise või läbivoolumeetodi kasutamist neil juhtudel, kui tegemist on näiteks ainetega, mis kaovad lahusest kiiresti lendumise, fotolagunemise, sadestumise või biolagunemise tõttu. Edasised juhendid on esitatud publikatsioonis (11).

1.2. **MÕISTED**

Käesolevas metoodikas kasutatakse järgmisi mõisteid ja lühendeid.

Biomass on populatsiooni elusaine kuivmass. Käesoleva meetodi puhul mõõdetakse tavaliselt biomassi asendavaid näitajaid, nagu tallusjate võsude arv või pindala, seega osutatakse mõiste „biomass” kasutamisel ka nende asendusnäitajatele.

Kloroos on tallusja võsu koe kolletumine.

Kloon on organism või rakk, mis on tekkinud individuaalsest organismist mittesugulise paljunemise tulemusena. Samast kloonist pärinevad isendid on geneetiliselt identsed.

Koloonia on üksteisega liitunud tallusjate ema- ja tütarvõsude kogum (tavaliselt 2–4 tallusjat võsu). Mõnikord nimetatakse kolooniat ka taimeks.

▼ **M1**

EC_x on katsekeskkonnas lahustatud uuritava aine kontsentratsioon, mille puhul lemlle kasv pidurdub x % (nt 50 %) võrra, kui see taim puutub ainega kokku teatava ajavahemiku jooksul (kui kokkupuuteaeg erineb täielikust ehk tavaliselt katsetes kasutatavast kokkupuuteajast, tuleb selle pikkus täpselt märkida). Kasvukiirusega seotud EC väärtuse ja saagisega seotud EC väärtuse üheseks tähistamiseks kasutatakse vastavalt sümboleid E_rC ja E_yC, mille järel märgitakse kasutatud mõõtemuutuja, nt E_rC (tallusjate võsude arv).

Läbivoolukatse on katse, mille käigus katselahus pidevalt vahetub.

Tallusjas võsu on individuaalne lehetaoline lemlestruktuur. See on väikseim paljunemisevõimeline üksus, st isend.

Puhetumus osutab kõverdunud või puhetunud tallusjale võsule.

Kasv on mõõdetava suuruse (nt tallusjate võsude arv, kuivmass, märgmass, tallusjate võsude pindala) suurenemine katse ajal.

Kasvukiirus (keskmise kasvu erikiirus) on biomassi logaritmilise suurenemise uuritava ainega kokkupuute ajal.

Madalaim avastatava mõjuga kontsentratsioon on madalaim uuritud kontsentratsioon, mille puhul on näidatud, et teatava kokkupuuteaja jooksul pidurdab uuritav aine kontrolliga võrreldes statistiliselt oluliselt ($p < 0,05$) katseorganismi kasvu. Kõik madalaimast avastatava mõjuga kontsentratsioonist kõrgemad kontsentratsioonid peavad avaldama sama tugevat või tugevamat kahjulikku mõju kui madalaim avastatava mõjuga kontsentratsioon. Kui neid kahte tingimust ei ole võimalik täita, tuleb anda täielik selgitus, kuidas valiti madalaim avastatava mõjuga kontsentratsioon (ja ka avastatava mõjuga kontsentratsioon).

Mõõtemuutuja on mis tahes liiki muutuja, mida mõõdetakse, et ühe või mitme eri kostemuutuja kasutamisega väljendada katsetulemi. Käesoleva meetodi puhul on mõõtemuutujad tallusjate võsude arv, tallusjate võsude pindala, elusmass ja kuivmass.

Monokultuur on ühte liiki taimede kultuur.

Nekroos on surnud (nt valge või hügrofaanne) tallusja võsu kude.

Avastatava mõjuga kontsentratsioon on madalaimast avastatava mõjuga kontsentratsioonist allapoole järgmine uuritud kontsentratsioon.

Fenotüüp on organismi vaadeldavate tunnuste kogum, mille määrab tema geenide ja keskkonna vastastikune mõju.

Kostemuutujad on toksilisuse hindamiseks kasutatavad muutujad, mis tuletatakse biomassi kajastavatest mõõtemuutujatest mitmesuguste arvutuste abil. Käesoleva meetodi puhul on kasvukiirus ja saagis kostemuutujad, mis tuletatakse sellistest mõõtemuutujatest nagu tallusjate võsude arv, nende pindala, elusmass või kuivmass.

Poolstaatiline (uendatava lahusega) katse on katse, mille käigus lahust perioodiliselt, kindla ajavahemiku järel vahetatakse.

Staatiline katse on katse, mille käigus lahust ei uuendata.

▼ **M1**

Katsetulem on katse eesmärgile vastav üldise teguri muutus uuritava kemikaali mõjul võrreldes kontrollkultuuriga. Käesoleva meetodi puhul on katsetulem kasvu pidurdumine, mida võib väljendada erinevate ühel või mitmel mõõtemuutujal põhinevate kostemuutujate abil.

Katsekeskkond on täissünteetiline toitelaht, millel kasvatatakse katsetaimi uuritava ainega kokkupuutumise ajal. Tavaliselt lahustatakse uuritav aine katsekeskkonnas.

Saagis on kokkupuuteaja lõpus ja alguses leitud mõõtemuutuja väärtuste vahe, mis väljendab katse kestel toimunud biomassi suurenemist.

1.3. KATSE PÕHIMÕTE

Eksponentsiaalselt kasvavatel lemmelde perekonda (*Lemna*) kuuluvate taimede monokultuuridel lastakse kokku puutuda uuritava ainega erinevates kontsentratsioonides seitsme ööpäeva jooksul. Katse eesmärk on kvantitatiivselt kirjeldada uuritava aine mõju vegetatiivsele kasvule katseaja jooksul, võttes aluseks valitud mõõtemuutuja hinnangud. Peamine mõõtemuutuja on tallusjate võsude arv. Kuna mõni aine võib mõjutada muid mõõtemuutujaid rohkem kui tallusjate võsude arvu, mõõdetakse ka vähemalt ühte täiendavat mõõtemuutujat (tallusjate võsude üldpindala, kuivmass või elumass). Uuritava aine mõju kvantitatiivseks iseloomustamiseks võrreldakse kasvu uuritavas lahuses kasvuga kontroll-lahuses ja määratakse kontsentratsioon, mis põhjustab kasvukiiruse pidurdumise teatava x % (nt 50 %) võrra; selle kontsentratsiooni tähis on EC_x (nt EC_{50}).

Katsetulem on kasvu pidurdumine, kusjuures kasvu väljendatakse mõõtemuutuja väärtuse logaritmi suurenemisena kokkupuuteaja jooksul (keskmine kasvu erikiirus). Katselahuste seerias määratud keskmistest kasvu erikiirustest leitakse kontsentratsioon, mis vähendab kasvukiirust teatava protsendimäära x võrra (näiteks 50 %); selle kontsentratsiooni tähis on E_rC_x (nt E_rC_{50}).

Lisaks kasutatakse käesoleva meetodi korral kostemuutujana veel saagist, mida võib vaja olla teatavates riikides kehtestatud erieeskirjade täitmiseks. Saagis on kokkupuuteaja lõpus ja alguses määratud mõõtemuutujate väärtuste vahe. Lähtudes katselahuse seeriade puhul registreeritud saagistest, arvutatakse kontsentratsioon, mis põhjustab saagise vähenemise teatava x % (nt 50 %) võrra; selle kontsentratsiooni tähis on E_yC_x (nt E_yC_{50}).

Lisaks sellele võib statistiliselt määrata madalaima avastatava mõjuga kontsentratsiooni ja ka avastatava mõjuta kontsentratsiooni.

1.4. ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

Uuritava aine sisalduse määramiseks katsekeskkonnas peab olema piisavalt tundlik analüüsimeetod.

▼ **M1**

Katsetingimuste valimisel võib olla kasulik teada järgmisi uuritavat ainet iseloomustavaid näitajaid: struktuurivalem, puhtusaste, lahustuvus vees, püsivus vees, valguskindlus, pK_a , K_{ow} , aururõhk ja biolagundatavus. Lahustuvust vees ja aururõhku võib kasutada Henry konstandi arvutamiseks, mis näitab, kas katse ajal on tõenäoline märkimisväärne uuritava aine kadu. See aitab selgitada, kas aine kao ärahoidmiseks on vaja erimeetmeid. Kui andmeid aine lahustuvuse ja püsivuse kohta on vähe, soovitatakse hinnata neid omadusi katsetingimustes, s.o sama toitelahuse, temperatuuri ja valgusrežiimi puhul nagu katseki.

Kui katsekeskkonna pH reguleerimine on eriti tähtis, nt hüdrolüütiliselt ebapüsivate metallide või muude ainete mõju uurimisel, soovitatakse katselahusele lisada puhvrit (vt punkt 1.7.4, esimene lõik). Täiendavad juhised selliste ainete mõju uurimiseks, mille füüsikaliskemilised omadused raskendavad seda uurimist, on esitatud publikatsioonis (11).

1.5. STANDARDDAINE

Katse korrektse läbiviimise kontrollimiseks võib kasutada rahvusvahelistes võrdluskatsetes (10) kasutatavaid standardaineid, näiteks 3,5-diklorofenooli. Kontrolli standardainega soovitatakse teha vähemalt kaks korda aastas või, kui katseid tehakse harvemini, siis paralleelselt uuritava aine toksilisuse määramisega.

1.6. KATSE VASTAVUS NÕUETELE

Et katse vastaks nõuetele, peab tallasjate võsude arvu kahekordistumise aeg kontrollkultuuride puhul olema alla 2,5 ööpäeva (alla 60 tunni), mis vastab ligikaudu seitsmekordsele kasvule seitsme ööpäeva jooksul ja keskmisele kasvu erikiirusele $0,275$ ööpäev⁻¹. Käesolevas metoodikas kirjeldatud toitelahuste ja katsetingimuste puhul võib seda kriteeriumi täita staatilise katse tingimustes (8). Oletatavalt saab seda kriteeriumi täita ka poolstaatilise ja läbivoolukatse tingimustes. Kahekordistumisaja arvutamist on selgitatud punktis 2.1.

1.7. MEETODI KIRJELDUS

1.7.1. Seadmed

Kõik katsekeskkonnaga kokku puutuvad seadmed peavad olema valmistatud klaasist või muust keemiliselt inertest materjalist. Kultuuride kasvatamiseks ja katseteks kasutatavad klaasnõud peavad olema steriilsed ja puhastatud keemilistest saasteainetest, mis võiksid leostuda katsekeskkonda. Katsenõud peavad olema piisavalt laiad, et kontrollnõudes kasvavad eri kolooniate tallasjad võsud katse lõpus ei hakkaks üksteist katma. Ei ole tähtis, kas juured puudutavad katsenõu põhja, kuid on soovitatav, et nõu sügavus oleks vähemalt 20 mm ja maht vähemalt 100 ml. Kui need tingimused on täidetud, ei ole nõu tüübi valik tähtis. Sobivad nii nõuetekohaste mõõtmega keeduklaasid, kristallisaatorid kui ka klaasist Petri tassid. Katsenõud peavad olema kaetud, et vähendada keskkonna aurumist ja juhulikku saastumist, kuid samal ajal peab olema tagatud vajalik õhuhetetus. Nõuetekohased katsenõud ja eriti nende kaaned ei tohi varjata valgust või muuta selle spektrit.

▼ **M1**

Kultuure ja katsenõusid ei hoita koos. Sellepärast on kõige parem kasutada eraldi fütotrone, inkubaatoreid või kasvukambreid. Valguse intensiivsus ja temperatuur peavad olema reguleeritavad ja need hoitakse konstantsed (vt punkt 1.7.8).

1.7.2. **Katseorganismid**

Käesolevas katses kasutatakse katseorganismina küürlemmelt (*Lemna gibba*) või väikest lemmelt (*Lemna minor*). Mürgisuse katsetes kasutatavate lemmeliikide lühikirjeldus on esitatud 1. liites. Taimmaterjali võib saada kultuuride kollektsoonist, teisest laborist või loodusest. Loodusest kogutud materjali kasvatatakse enne kasutamist vähemalt kaheksa nädalat kultuuris samas toitelahuses, mida kasutatakse katsetes. Loodusliku lähtekultuuri kogumiskohta ei tohi mõjutada ilmsed saasteallikad. Teisest laborist või kultuuride kollektsoonist saadud taimmaterjali kasvatatakse enne kasutamist samal viisil vähemalt kolm nädalat. Taimmaterjali allikas ning kasutatud liik ja kloon (kui see on teada) märgitakse katseprotokollis.

Tuleb kasutada monokultuure, mis ei ole nähtavalt saastatud muude organismidega, nagu vetikad või algloomad. Väikese lemle, *L. minor*'i terve taim moodustab 2–5 tallusjast võsust koosneva koloonia; küürlemle, *L. gibba* terve koloonia võib koosneda kuni seitsmest tallusjast võsust.

Katses kasutatavate taimede kvaliteet ja ühetaolisus mõjutavad märkimisväärselt katsetulemust, sellepärast tuleb need valida hoolikalt. Kasutatakse noori kiirekasvulisi taimi, millel pole nähtavaid kahjustusi või värvidefekte (kloroos). Hea kvaliteediga kultuuris on rohkesti vähemalt kahest tallusjast võsust koosnevaid kolooniaid. Üksikute tallusjate võsude rohkus osutab keskkonnastressile (nt toitainete vaegus); sellisest kultuurist saadud taimmaterjali ei tohi katses kasutada.

1.7.3. **Kasvatamine**

Kultuuri hooldamissageduse vähendamiseks (nt kui teatava aja jooksul ei kavandata katseid *Lemna*'ga) võib kultuure hoida vähendatud valgustatuse ja madala temperatuuri (4–10 °C) juures. Kasvatamise üksikasjad on esitatud 2. liites. Vetikate või muude organismidega saastumise tunnuste ilmnemisel tuleb lemle tallusjate võsude osaproov pindmiselt steriliseerida ja seejärel üle kanda värskesse toitelahusesse (vt 2. liide). Ülejäänud saastunud kultuur visatakse sel juhul ära.

Vähemalt seitse päeva enne katset kantakse piisav arv kolooniaid aseptiliselt värskesse steriilsesse toitelahusesse ja neid kasvatatakse katsetingimustes 7–10 ööpäeva jooksul.

1.7.4. **Katsekeskkond**

Väikese lemle ja küürlemle puhul soovitatakse kasutada allpool kirjeldatud toitelahuseid. pH-d reguleeriva puhvri lisamist toitelahusesse tuleb hoolikalt kaaluda, kui oletatakse, et puhver võib reageerida uuritava ainega ja mõjutada toksilisuse avaldumist (väikese lemle toitelahusesse lisatakse 4-morfoliinpropaansulfoonhapet, CASi nr 1132–61–2; EINECSI nr 214–478–5, küürlemle toitelahusesse lisatakse NaHCO₃). Võib kasutada ka Steinbergi toitelahust (12), kui nõuetele vastavuse kriteeriumid on täidetud.

▼ M1

Väikese lemle kasvatamiseks ja sellega katsete tegemiseks soovitatakse kasutada Rootsi standardiga (SIS) lemle kasvatamiseks ette nähtud toitelahuse modifikatsiooni. Selle toitelahuse koostis on esitatud 3. liites.

Küürlemle kasvatamiseks ja sellega katsete tegemiseks soovitatakse kasutada 3. liites kirjeldatud toitelahust 20X-AAP.

Väikese lemle ja küürlemle puhul võib kasutada ka 3. liites kirjeldatud Steinbergi toitelahust, kui nõuetele vastavuse kriteeriumid on täidetud.

1.7.5. **Katselahused**

Katselahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel. Uuritava aine põhilahus valmistatakse tavaliselt aine lahustamisega toitelahuses.

Tavaliselt ei tohi uuritava aine kõrgeim kontsentratsioon ületada aine lahustuvust vees katsetingimustes. Tuleb veel silmas pidada, et lemle liigid ujuvad pinnal ja võivad kokku puutuda vee ja õhu piirpinnale koguneva ainega (nt vees vähelahustuvad, hüdrofoobsed või pindaktiivsed ained). Sel juhul puutub lemle kokku mitte lahuses oleva materjali kontsentratsiooniga, vaid see võib – olenevalt uuritava aine omadustest – olla kõrgem selle aine lahustuvusest vees. Vees vähelahustuva aine puhul võib olla vaja valmistada selle aine kontsentreeritud põhilahus või dispersioon, kasutades orgaanilist lahustit või dispergeerivat ainet, et hõlbustada täpsete uuritava aine koguste lisamist katsekeskkonda ja soodustada aine lahustumist või pihustumist. Tuleb teha kõik sellise materjali kasutamise vältimiseks. Abilahusti või dispergeeriva aine ise ei tohi olla fütotoksiline. Tavaliselt kasutatakse lahustid, mis kuni kontsentratsioonini $100 \mu\text{l}^{-1}$ ei ole fütotoksilised, on näiteks atsetoon ja dimetüülformamiid. Kui kasutatakse lahustit või dispergeerivat ainet, peab selle lõppkontsentratsioon, mis märgitakse katseprotokollis, olema võimalikult madal ($\leq 100 \mu\text{l}^{-1}$) ning kõigi katse- ja kontrollkultuuride puhul tuleb kasutada lahustit või dispergeeriva aine ühesugust kontsentratsiooni. Täiendavad juhised dispergeeriva aine kasutamise kohta on esitatud publikatsioonis (11).

1.7.6. **Katse- ja kontrollrühmad**

Uuritava aine sobivate kontsentratsioonide valimiseks peaks eelnevalt näiteks mõjuvahemiku hindamise katsega välja selgitama, kui mürgine see aine on lemlele. Lõpliku katse tegemisel kasutatakse tavaliselt vähemalt viit geomeetrilise jadana järjestatud kontsentratsiooni. Uuritavate kontsentratsioonide jada kordaja ei peaks üldiselt olema suurem kui 3,2, kuid lameda kontsentratsiooni-mõju kõvera korral võib kordaja siiski olla suurem. Kui kasutatakse vähem kui viit kontsentratsiooni, tuleb seda põhjendada. Iga uuritava kontsentratsiooni puhul kasutatakse vähemalt kolme paralleelkultuuri.

Uuritavate kontsentratsioonide vahemiku valimisel (mõjuvahemiku hindamise katse ja lõpliku toksilisuskatse puhul) tuleb arvestada järgmist.

▼ **M1**

- EC_x määramisel peaks EC_x väärtus olema uuritavate kontsentratsioonide vahemikus, et tagada sobiv usaldusnivoo. Näiteks EC_{50} määramisel peab kõrgeim uuritav kontsentratsioon olema kõrgem kui EC_{50} väärtus. Kui EC_{50} väärtus jääb väljapoole uuritavate kontsentratsioonide vahemikku, on asjaomased usaldusvahemikud laiad ja lähendatud mudeli sobivust katseandmetega on raske statistiliselt hinnata.

- Kui eesmärk on madalaima avastatava mõjuga kontsentratsiooni ja ka avastatava mõjuga kontsentratsiooni määramine, peab madalaim uuritav kontsentratsioon olema nii madal, et kasv ei oleks oluliselt aeglasem kui kontrollkultuuris. Peale selle peab kõrgeim uuritav kontsentratsioon olema nii kõrge, et kasv oleks oluliselt aeglasem kui kontrollkultuuris. Kui see nii ei ole, tuleb katset korrata teise kontsentratsioonivahemikuga (kui kõrgeim uuritav kontsentratsioon ei ole juba võrdne lahustuvuse või kõrgeima nõutava piirkontsentratsiooniga, näiteks 100 mg l^{-1}).

Igas katses tehakse ka kontrollkultuurid, mille toitelaht, tallusjate võsude ja kolooniate arv, keskkonnatingimused ning määramiskatsed on samad kui katsenõude puhul, kuid millele ei ole lisatud uuritavat ainet. Kui kasutatakse abilahustit või disperseerivat ainet, tuleb lisaks teha kontrollkultuur, milles lahusti või disperseeriva aine kontsentratsioon on sama kui uuritavat ainet sisaldavates nõudes. Paralleelsete kontrollnõude (ja vajaduse korral lahustit sisaldavate kontrollnõude) arv peab olema vähemalt võrdne iga kontsentratsiooni korral kasutatavate nõude arvuga või paremal juhul sellest kaks korda suurem.

Kui avastatava mõjuga kontsentratsiooni määrata ei ole vaja, võib katseplaani muuta nii, et suurendatakse uuritavate kontsentratsioonide arvu ja vähendatakse paralleelkultuuride arvu ühe kontsentratsiooni kohta. Kontrollkultuure peab siiski olema vähemalt kolm.

1.7.7. **Kokkupuude uuritava ainega**

Aseptilistes tingimustes kantakse inokulum-kultuurist juhuvaliku alusel paigutatud katsenõudesse üle 2–4 nähtavast tallusjast võsust koosnevad kolooniad. Iga katsenõu peaks sisaldama kokku 9–12 tallusjat võsu. Tallusjate võsude ja kolooniate arv peab kõikides katsenõudes olema sama. Käesoleva meetodiga saadud kogemused ja laboratooriumidevahelised võrdluskatsed näitavad, et kasvukiiruse 4–7-protsendilise või saagise 10–15-protsendilise erinevuse määramiseks uuritava aine eri kontsentratsioonidel piisab, kui uuritava aine ühe kontsentratsiooniga tehakse paralleelkatsed kolmes nõus, kui katse alguses sisaldab iga paralleelkultuuri nõu 9–12 tallusjat võsu (10).

Katsenõud paigutatakse inkubaatorisse juhuslikult, et vähendada paigutusest tingitud valgustatuse ja temperatuuri erinevuste mõju. Igal katseandmete registreerimisel või veelgi sagedamini on katsenõud vaja ka kas rühmiti või juhuvaliku alusel vastastikku ümber paigutada.

▼ **M1**

Kui eelkatse näitab, et uuritava aine kontsentratsioon ei püsi 7-päevase katse jooksul samal tasemel (katse lõpus mõõdetud kontsentratsioon on alla 80 % mõõdetud algtasemest), soovitakse kasutada poolstaatilist katserežiimi. Sel juhul lastakse kolooniatel katse jooksul vähemalt kahel korral (nt kolmandal ja viiendal katsepäeval) kokku puutuda värskest valmistatud katselahusega ja kontroll-lahusega. Kui sageli lastakse kultuuril puutuda kokku värske katsekeskonnaga, see on oleneb uuritava aine püsivusest; kui aine on väga ebastabiilne või lenduv, siis ligikaudu püsiva kontsentratsiooni hoidmiseks peab see sagedus olema suurem. Mõnel juhul võib olla vaja kasutada läbivoolumeetodit (11, 13).

Käesolevas metoodikas ei käsitleta kokkupuutekatset, milles uuritav aine pritsitakse taimelehtedele (vt 14).

1.7.8. **Inkubeerimistingimused**

Kasutatakse päevavalgus- või külmvalge spektriga pidevat fluorestsentsvalgust, mille intensiivsus valitakse vahemikus 85–135 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (vastab 6 500 – 10 000 luksile); valgustatust mõõdetakse fotosünteesiks sobivas lainepikkuse vahemikus 400–700 nm punktides, mis on valgusallikast sama kaugel kui lemle tallusjad võsud. Katseala ulatuses ei tohi valgustatus erineda valitud väärtusest üle 15 %. Valgustatuse mõõdetav väärtus sõltub mõõtmismeetodist ja eriti sensori tüübist. Ühest suunast langevat valgust mõõtvale sensorile eelistatakse sfäärilist sensorit (reageerib nii ülalt- kui altpoolt mõõdetasapinda igast suunast langevale valgusele) või koosinussensorit (reageerib ültpoolt mõõdetasapinda igast suunast langevale valgusele); käesoleva meetodi kohase mitmepunktilise valgustuse puhul annavad need sensorid suuremaid väärtusi.

Katsenõude temperatuur peab olema 24 ± 2 °C. Katse ajal ei tohi kontrollkeskkonna pH tõusta enam kui 1,5 ühiku võrra. Kui pH tõuseb üle 1,5 ühiku, siis loetakse siiski, et katse vastab nõuetele, kui saab näidata, et nõuetele vastavuse kriteeriumid on täidetud. Erijuhtudel, nt ebapüsivate ainete või metallide mõju uurimisel tuleb pH nihkumisele pöörata erilist tähelepanu. Täiendavad juhised on esitatud publikatsioonis (11).

1.7.9. **Katse kestus**

Katse lõpetatakse 7 ööpäeva möödumisel taimede ülekandmisest katsenõudesse.

1.7.10. **Mõõtmised ja analüütilised määramised**

Katse alguses loendatakse ja registreeritakse tallusjate võsude arv katsenõudes, jälgides, et kõik väljaulatuvad selgesti nähtavad tallusjad võsud oleksid arvesse võetud. Normaalse või ebanormaalse välimusega tallusjate võsude arv määratakse katse alguses, vähemalt üks kord kolme ööpäeva kohta (st vähemalt kaks korda 7-päevase katse jooksul) ja katse lõpus. Registreeritakse muutused taimede arengus, nt tallusjate võsude suurus, välimus, nekroosi, kloroosi või puhetumise ilmingud, kolooniate lagunemine, kolooniate ujuvuse halvenemine, juurte pikkuse ja välimuse muutused. Registreerida tuleb ka olulised tähelepanekud katsekeskkonna kohta (nt mittelahustunud materjali olemasolu, vetikate kasv katsenõudes).

▼ **M1**

Lisaks tallusjate võsude arvu määramisele katse jooksul hinnatakse ka uuritava aine mõju ühele või mitmele järgmisele mõõtemuutujale:

i) tallusjate võsude üldpindala;

ii) kuivmass;

iii) elumass.

Tallusjate võsude üldpindala eelis on, et seda saab määrata igas katse- ja kontrollnõus katse alguses, katse käigus ja lõpus. Kuiv- või elumass määratakse katse alguses inokulum-kultuuri representatiivses proovis ning katse lõpus igast katse- ja kontrollnõust saadud taimmaterjali alusel. Kui tallusjate võsude üldpindala ei määrata, eelistatakse elumassi määramisele kuivmassi määramist.

Tallusjate võsude üldpindala, kuivmass ja elumass määratakse järgmiselt.

i) *Tallusjate võsude üldpindala.* Kõigi kolooniate tallusjate võsude üldpindala võib määrata pildianalüüsi abil. Katsenõu ja taimede siluett jäädvustatakse videokaameraga (nt asetades katsenõu valguskastile) ja saadud kujutis digitaliseeritakse. Kasutades kalibreerimiseks teadaoleva pindalaga tasapinnalisi kujundeid, võib seejärel määrata katsenõus olevate tallusjate võsude üldpindala. Tuleb jälgida, et katsenõu serv ei segaks määramist. Teine, tömahukam meetod on teha katsenõu ja taimede fotokoopia, lõigata välja saadud kolooniate siluett ja määrata nende pindala lehepinnaanalüsaatori või millimeetripaberi abil. Võib kasutada ka muid määramismeetodeid (nt kolooniate siluetele ja ühikpindalale vastava paberi masside suhte määramine).

ii) *Kuivmass.* Igast katsenõust kogutakse kõik kolooniad ja neid loputatakse destilleeritud või deioniseeritud veega. Kolooniatest eemaldatakse filterpaberi abil ülemäärane vesi ja neid kuivatatakse 60 °C juures püsiva kaaluni. Kõik juuretükid võetakse määramisel arvesse. Kuivmass väljendatakse täpsusega vähemalt 0,1 mg.

iii) *Elumass.* Kõik kolooniad kantakse üle eelnevalt kaalutud polüstüreenist (või muust inertsest materjalist) katseklaasidesse, mille ümarates põhjades on väikesed (1 mm) avad. Katseklaase tsentrifuugitakse toatemperatuuril kiirusel 3 000 pöört minutis 10 minuti jooksul. Katseklaasid niimoodi kuivatatud kolooniatega kaalutakse ja elumassi leidmiseks lahutatakse saadud tulemusest tühja katseklaasi mass.

1.7.10.1. Mõõtmiste ja analüütiliste määramiste sagedus

Staatilise katse puhul mõõdetakse pH igas katsenõus katse alguses ja lõpus. Poolstaatilistes katsetes mõõdetakse värske katselahuse pH enne iga lahusevahetust ja määratakse ka iga „kasutatud” lahuse pH.

▼ M1

Valgustatus mõõdetakse fütotroni, inkubaatori või kasvukambri punktides, mis on valgusallikast samal kaugusel kui lemle tallusjad võsud. Valgustatust mõõdetakse katse jooksul vähemalt üks kord. Katsekeskkonna temperatuur fütotronis, inkubaatoris või kasvukambri samades tingimustes hoitavas asendunõus registreeritakse vähemalt üks kord päevas.

Uuritava aine kontsentratsioon määratakse katse ajal sobiva vaheaja tagant. Staatilise katse puhul tuleb uuritava aine kontsentratsioon määrata vähemalt katse alguses ja lõpus.

Poolstaatilise katse puhul, kus oletatakse uuritava aine kontsentratsiooni muutumist üle 20 % nominaalväärtusest, tuleb see kontsentratsioon määrata kõigis värskest valmistatud katselahustes ja samades lahustes pärast nende asendamist (vt punkt 1.7.7, kolmas lõik). Kui uuritava aine mõõdetud algkontsentratsioon erineb nominaalsest enam kui 20 % võrra, kuid on piisavad tõendid, et algkontsentratsiooni väärtus on korratav ja püsiv (st 80–120 % algkontsentratsioonist), võib keemilised määramised teha ainult kõrgeima ja madalaima uuritava kontsentratsiooni puhul. Kõigil juhtudel on aine kontsentratsioon igal uuritaval väärtusel vaja määrata enne katselahuse vahetamist ainult ühes paralleelkultuuri nõus (või paralleelkultuuridest kokku segatud proovis).

Läbivoolukatse puhul kasutatakse sama proovivõtturežiimi kui poolstaatilises katses, kaasa arvatud analüüs katse alguses, katse käigus ja lõpus, selle erinevusega, et „kasutatud” lahust ei ole vaja analüüsida. Nendes katsetes kontrollitakse igal katsepäeval lahenduslahuse ja uuritava aine või uuritava aine põhilahuse voolukiirust.

Kui on tõendatud, et uuritava aine kontsentratsioon püsib kogu katse ajal rahuldavalt nominaalse või mõõdetud algväärtuse läheduses täpsusega $\pm 20\%$, võib katsetulemusi analüüsida nominaalse või mõõdetud algväärtuse põhjal. Kui kõrvalekalle nominaalsest või mõõdetud algväärtusest on suurem kui $\pm 20\%$, analüüsitakse katsetulemusi katse geomeetrilise keskmise kontsentratsiooni alusel või kasutatakse uuritava aine kontsentratsiooni kõrvalekaldeid kajastavaid mudeleid (11).

1.7.11. Piirsalduskatse

Teatavatel asjaoludel, näiteks kui eelkatse näitab, et kontsentratsioonil kuni $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ või katsekeskkonnas lahustuvuse piirkontsentratsioonil (olenevalt sellest, kumb on madalam) ei avalda uuritava aine toksilist mõju, võib teha piirsalduskatse, milles võrreldakse kontrollrühmas ja ühes katserühmas (kontsentratsioonil $100 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ või lahustuvuse piirkontsentratsioonil) avalduvat mõju. Piirsalduskatse tegemisel soovitatakse kindlasti määrata ka kokkupuutekontsentratsioon. Kõik eespool kirjeldatud katsetingimused ja nõuetele vastavuse kriteeriumid kehtivad ka piirsalduskatse puhul, kuid uuritava ainega tuleb teha vähemalt kahekordne arv paralleelkatseid. Kasvu analüüsimiseks kontroll- ja katseseerias võib keskmisi väärtusi võrrelda statistilise kriteeriumi (nt Studenti t-kriteerium) abil.

▼ M1**2. KATSEANDMED JA NENDE ESITAMINE****2.1. KAHEKORDISTUMISAEG**

Tallusjate võsude arvu kahekordistumise aja (T_d) määramiseks ja katse nõuetele vastavuse sellekohase kriteeriumi täitmise kindlakstegemiseks (punkt 1.6) kasutatakse kontrollkultuuridega saadud andmeid ja järgmist valemit:

$$T_d = \ln 2/\mu$$

kus μ on punkti 2.2.1 esimeses ja teises lõigus kirjeldatud viisil määratud keskmine kasvu erikiirus.

2.2. KOSTEMUUTUJAD

Kõnesoleva katse eesmärk on määrata uuritava aine mõju lemle vegetatiivsele kasvule. Kuna liikmesriikide eelistused ja reguleerimisvajadused on erinevad, käsitletakse käesolevas metoodikas kahte kostemuutujat. Et katsetulemused oleksid vastuvõetavad kõikides liikmesriikides, tuleb uuritava mõju hindamisel kasutada mõlemat järgnevalt kirjeldatud kostemuutujat (a ja b).

a) Keskmine kasvu erikiirus. See kostemuutuja arvutatakse katse ajal toimuva tallusjate võsude arvu logaritmi muutuse ja veel ühe mõõtemuutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või elusmassi) logaritmi muutuse ning selleks kulunud aja (ööpäevades) alusel kontrollkultuurides ja igas uuritava ainega kultuuris. Seda nimetatakse mõnikord ka suhteliseks kasvukiiruseks (15).

b) Saagis. See kostemuutuja arvutatakse katse lõpuks toimunud tallusjate võsude arvu muutuse ja lisaks veel ühe mõõtemuutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmass või elusmass) muutuse alusel kontrollkultuurides ning igas uuritava ainega kultuuris.

Tuleb märkida, et nende kahe kostemuutuja abil arvatud toksilisuse väärtused ei ole võrreldavad ning seda erinevust tuleb katsetulemuste kasutamisel arvestada. Kui järgitakse käesoleva metoodika tingimusi, on asjaomaste lähenemisviiside matemaatilise aluse eripära tõttu keskmisel kasvu erikiirusel põhinevad EC_x väärtused ($E_r C_x$) üldiselt suuremad kui saagise alusel saadud tulemused ($E_y C_x$). Seda erinevust ei tuleks tõlgendada kahe kostemuutuja tundlikkuse erinevusena; asjaomased väärtused on lihtsalt matemaatiliselt erinevad. Keskmise kasvu erikiiruse mõiste põhineb lemmelde üldisel eksponentsiaalsel kasvu piiramata kultuuris, kusjuures toksilisus määratakse kasvukiiruses avalduva mõju alusel ja see ei olene kontrollkultuuri kasvu erikiiruse absoluutsest tasemest, kontsentratsiooni-mõju kõvera tõusust või katse kestusest. Kui kostemuutujaks on saagis, siis sõltuvad tulemused aga kõikidest mainitud kõrvalmuutujatest. $E_y C_x$ oleneb igas katses kasutatud lemleliigi kasvu erikiirusest ja maksimumalusest kasvu erikiirusest, mis võib olla eri lemleliikide ja isegi eri kloonide puhul erinev. Seda kostemuutujat ei tohi kasutada, kui võrreldakse lemleliikide või -kloonide tundlikkust toksiliste ainete suhtes. Kuigi teaduslikust aspektist on toksilisuse määramiseks parem kasutada kasvu erikiirust, esitatakse käesolevas metoodikas teatavate liikmesriikide eeskirjade järgimiseks ka saagisel põhinev toksilisuse määramise käik.

▼ **M1**

Toksilisuse hinnang peab põhinema tallusjate võsude arvul ja ühel täiendaval mõõtemuutujal (tallusjate võsude üldpindala, kuivmass või elumass), sest mõned ained võivad mõjutada muid mõõtemuutujaid palju enam kui tallusjate võsude arvu. See mõju jääks avastamata, kui toksilisuse määramiseks kasutatakse ainult tallusjate võsude arvu.

Tallusjate võsude arv ja muud registreeritud mõõtemuutujad (tallusjate võsude üldpindala, kuivmass, elumass) kantakse iga mõõtmise puhul koos uuritava aine kontsentratsiooni väärtustega tabelisse. Avastatava mõjuga kontsentratsiooni, madalaima avastatava mõjuga kontsentratsiooni ja EC_x määramiseks ei kasutata andmetöötles mitte katseseeria jaoks arvatud keskmisi väärtusi, vaid individuaalsete paralleelkultuuridega saadud väärtusi.

2.2.1. **Keskmine kasvu erikiirus**

Kontrollkultuuride ja uuritava ainega kultuuride puhul arvutatakse teatava ajavahemiku keskmine kasvu erikiirus igas nõus kasvu iseloomustavate muutujate – tallusjate võsude arv ja ühe täiendava mõõtemuutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või elumassi) – logaritmi suurenemise alusel järgmise valemi abil:

$$\mu_{i-j} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t}$$

kus:

- μ_{i-j} on keskmine kasvu erikiirus ajavahemikul $i-j$,
- N_i on mõõtemuutuja väärtus katse- või kontrollkultuuri sisaldas nõus ajahetkel i ,
- N_j on mõõtemuutuja väärtus katse- või kontrollkultuuri sisaldas nõus ajahetkel j ,
- t on ajavahemik $i-j$.

Iga katse- ja kontrollseeria puhul arvutatakse kasvukiiruse keskväärtus ja dispersiooni hinnang.

Keskmine kasvu erikiirus arvutatakse kogu katseaja kohta (eespool esitatud valemis vastab katse algusele ajahetk i ja katse lõpule ajahetk j). Iga uuritava kontsentratsiooni ja kontrolli puhul arvutatakse keskmise kasvu erikiiruse keskväärtus ja dispersiooni hinnang. Lisaks sellele hinnatakse kasvukiirust ka lõikude kaupa, et näiteks logaritmitud kasvukõverate uurimise abil hinnata uuritava aine mõju katse vältel. Lõikude kaupa leitud kasvukiiruste ja keskmise kasvukiiruse olulised erinevused osutavad kõrvalekaldumisele pidevast eksponentsiaalsest kasvust; sel juhul on kasvukõveraid vaja üksikasjalikult uurida. Konservatiivse lähenemisviisi kohaselt tuleb sel juhul võrrelda uuritava ainega kultuurides maksimaalse pidurdumise ajavahemikul määratud kasvu erikiirusi kontrollkultuurides samal ajavahemikul määratud kasvu erikiirustega.

▼ M1

Iga uuritava kontsentratsiooni (katseseeria) puhul arvutatakse järgmise valemi abil kasvukiiruse pidurdumise protsent I_r :

$$\% I_r = \frac{(\mu_C - \mu_T)}{\mu_C} \times 100$$

kus:

- $\% I_r$ on keskmine kasvu erikiiruse pidurdumise määr protsentides,
- μ_C on keskmise kasvu erikiiruse (μ) keskvärtus kontrollseerias,
- μ_T on keskmise kasvu erikiiruse (μ) keskvärtus katseseerias.

2.2.2. Saagis

Uuritava aine mõju saagisele määratakse kahe mõõtemuutuja – tallusjate võsude arvu ja ühe täiendava mõõtemuutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmass või elusmass) – alusel, mille väärtused mõõdetakse igas uuritavas kultuuris katse alguses ja lõpus. Kuivmassi või elusmassi esialgne väärtus määratakse tallusjate võsude proovist, mis võetakse katsenõu inokuleerimiseks kasutatud kultuurist (vt punkt 1.7.3, teine lõik). Iga uuritava kontsentratsiooni ja kontrollkultuuri jaoks arvutatakse keskmine saagis ning dispersiooni hinnang. Iga katseseeria puhul arvutatakse saagise keskmine vähenemine protsentides $\%I_y$:

$$\% I_y = \frac{(b_C - b_T)}{b_C} \times 100$$

kus:

- $\%I_y$ on saagise vähenemine protsentides,
- b_C on lõppbiomassi ja algbiomassi vahe kontrollseeria puhul,
- b_T on lõppbiomassi ja algbiomassi vahe katseseeria puhul.

2.2.3. Kontsentratsiooni-mõju kõvera ehitamine

Ehitatakse kontsentratsiooni-mõju kõver, mis kajastab kostemuutuja protsentides väljendatud keskmise vähenemise määra (punkti 2.2.1 või 2.2.2 viimase lõigu kohaselt arvutatud I_r või I_y) sõltuvust uuritava aine kontsentratsiooni logaritmist.

2.2.4. EC_x hindamine

EC_x (nt EC_{50}) hinnangud tuleb leida nii keskmise kasvu erikiiruse kui ka saagise põhjal (vastavalt E_rC_x ja E_yC_x), mis omakorda leitakse tallusjate võsude arvu ja ühe täiendava mõõtemuutuja (tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või elusmassi) põhjal. Selle põhjuseks on asjaolu, et teatavad uuritavad ained mõjutavad tallusjate võsude arvu ja muid mõõtemuutujaid erinevalt. Otsitavad toksilisusparameetrid, mis tuleb arvutada iga pidurdustaseme x puhul, on järelikult neli EC_x väärtust: E_rC_x (leitakse tallusjate võsude arvu alusel), E_rC_x (leitakse tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või elusmassi alusel), E_yC_x (leitakse tallusjate võsude arvu alusel), E_yC_x (leitakse tallusjate võsude üldpindala, kuivmassi või elusmassi alusel).

▼ **M1**

2.3. STATISTILISED MEETODID

Eesmärk on leida regressioonanalüüsi abil kvantitatiivne seos kontsentratsiooni ja mõju vahel. Võib kasutada kaalutud lineaarset regressiooni pärast kosteandmete lineariseerivat teisendamist näiteks probit-, logit- või Weibulli ühikute kujule (16), kuid eelistada tuleb siiski mittelinearse regressiooni meetodeid, mis sobivad paremini vältimatute andmevigade ja sujuvast jaotusest kõrvalekallete puhul. Kui andmevad lähenevad null-pidurdusele või täielikule pidurdusele, võivad need teisendustel võimendada ja segada analüüsi (16). Tuleb silmas pidada, et probit-, logit- või Weibulli teisendusega standardised analüüsimeetodid on ette nähtud kõik-või-mitte-midagi-andmete (nt suuremus või elulemus) analüüsiks ja kasvukiiruse või biomassi andmete analüüsimiseks tuleb neid kohandada. Konkreetsed meetodid EC_x väärtuste määramiseks pidevate andmete alusel on esitatud publikatsioonides (17, 18, 19).

Kummagi kostemuutuja puhul arvutatakse kontsentratsiooni-mõju kõverast punkti EC_x hinnangud. Võimaluse korral määratakse iga hinnangu usaldusvahemik 95-protsendilise usaldusnivoo jaoks. Kosteandmete sobivust regressioonimudeliga hinnatakse graafiliselt või statistiliselt. Regressioonanalüüsiks ei kasutata katserühma keskvärtusi, vaid individuaalsete paralleelkultuuride koste väärtusi.

Kui tavalised regressioonimudelid ja -meetodid katseandmete puhul ei sobi, võib EC_{50} hinnangute ja usaldusvahemike leidmiseks kasutada ka lineaarset interpolatsiooni koos andmete usaldusväarsuse iteratiivse kontrollimisega (*bootstrapping*) (20).

Selleks et määrata madalaim avastatava mõjuga kontsentratsioon ja sellest ka avastatava mõjuta kontsentratsioon, on uuritava ainega kultuuride keskvärtusi vaja võrrelda dispersioonanalüüsi (ANOVA) abil. Iga kontsentratsiooni puhul leitud keskvärtust võrreldakse seejärel kontrollkultuuride keskvärtusega, kasutades sobivat mitmekordse võrdluse või trendikatse meetodit. Dunnetti või Williamsi test võib osutada sobivaks (21, 22, 23, 24). Tuleb hinnata, kas kehtib dispersioonanalüüsi eeldus, et dispersioon on homogeenne. Selle hinnangu võib saada graafiliselt või formaaltesti abil (25). Sobivad Levene'i või Bartletti testid. Kui dispersioonide homogeensuse eeldus ei kehti, võib mõnikord olla abi andmete logaritmilisest teisendamisest. Kui dispersiooni heterogeensus on väga suur ja seda ei saa korrigeerida teisendamisega, tuleb kaaluda Jonkheere alanevate astmetega trenditesti kasutamist. Täiendavad juhised avastatava mõjuta kontsentratsiooni määramiseks on esitatud publikatsioonides (19).

Teaduse viimaste saavutuste põhjal on soovitatud loobuda avastatava mõjuta kontsentratsiooni mõistest ja asendada see regressioonist leitud punkti EC_x hinnangutega. Kõnesoleva katse jaoks lemmeldel ei ole sobivat x väärtust veel kindlaks määratud. Nähtavasti on see väärtus 10–20 % vahemikus (olenevalt valitud kosteparameetrist); parem oleks esitada nii EC_{10} kui ka EC_{20} .

3. TULEMUSTE ESITAMINE

3.1. KATSEPROTOKOLL

Katseprotokollis esitatakse järgmine teave.

Uuritav aine:

— füüsikaline iseloomustus ja füüsikalised-keemilised omadused, kaasa arvatud lahustuvus vees;

▼ **M1**

- kemikaali identifitseerimiseks vajalikud andmed (nt CASi number), kaasa arvatud puhtusaste.

Katseorganismi liik:

- teaduslik nimi, kloon (kui see on teada) ja päritolu.

Katsetingimused:

- kasutatud katsemeetod (staatiline, poolstaatiline või läbivoolukatse);
- katse alustamise kuupäev ja kestus;
- katsekeskkond;
- katseplaani kirjeldus: katsenõud ja nõukatted, lahuste mahud, kolooniate ja tallusjate võsude arv ühe katsenõu kohta katse alguses;
- uuritavad kontsentratsioonid (nominaalsed või mõõdetavad, olenevalt sellest, mis sobib) ja paralleelkultuuride arv ühe kontsentratsiooni kohta;
- põhi- ja katselahuste valmistusviisid, sh lahusti või disperseeriva aine kasutamine;
- katsetemperatuur;
- valgusallikas, valguse intensiivsus ja ühtlus;
- katsekeskkonna ja kontrollkultuuri keskkonna pH väärtused;
- uuritava aine kontsentratsioonid, analüüsimeetod ja asjakohased kvaliteedihinnangu andmed (valideerimisuuringud, analüüsiandmete standardhälbed ja usaldusvahemikud);
- tallusjate võsude arvu ja muude mõõtemuutujate (kuivmass, elumass, tallusjate võsude pindala) määramise meetodid;
- kõik kõrvalekaldumised käesolevast metoodikast.

Katsetulemused:

- originaalandmed: tallusjate võsude arv ja muude mõõtemuutujate väärtused igas uuritava ainega kultuuris ja kontrollkultuuris iga vaatluse ja analüüsi korral;
- iga mõõtemuutuja keskvärtus ja standardhälve;
- igale kontsentratsioonile vastav kasvukõver (soovitatakse esitada kasvukõver logaritmitud mõõtemuutuja järgi, vt punkt 2.2.1, teine lõik);
- kontrollkultuuri kahekordistumise aeg või kasvukiirus, mis määratakse tallusjate võsude arvu järgi;
- iga uuritava ainega paralleelkultuuri puhul arvatud kostemuutujate väärtused, keskvärtused ja paralleelkultuuride variatsioonikordaja;
- kontsentratsiooni-mõju sõltuvuse graafik;
- kostemuutujate (nt EC₅₀, EC₁₀, EC₂₀) abil väljendatud toksilisuse hinnangud ja nende usaldusvahemikud. Madalaim avastatava mõjuga kontsentratsioon ja ka avastatava mõjuta kontsentratsioon (kui need arutati) ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;

▼ **M1**

- kui kasutati dispersioonanalüüsi (ANOVA), siis avastatava efekti suurus (nt väikseim oluline erinevus);
- uuritava ainega kultuuris jälgitud kasvu stimuleerimine;
- visuaalsed fütotoksilisuse tunnused ja tähelepanekud katselahuste kohta;
- tulemuste arutelu, kaasa arvatud käesolevast metoodikast kõrvalkaldumise võimalik mõju katsetulemustele.

4. **KIRJANDUS**

- 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, available at http://guidance.echa.europa.eu/docs/guidance_document/-information_requirements_en.htm?time=1234958685#A.
- 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. 8pp.
- 6) AFNOR – Association Française de Normalisation. (1996). XP T 90–337: Détermination de l’inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.
- 7) SSI – Swedish Standards Institute. (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (Rootsi keeles.)
- 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**

I. liide

Lemmelde liikide kirjeldus

Üldnime lemled (*Lemna* spp.) all tuntud veetaimed kuuluvad lemleliste (*Lemnaceae*) sugukonda, mis hõlmab paljusid ülemaailmse levikuga liike, mis kuuluvad nelja perekonda. Nende morfoloogilisi erinevusi ja taksonoomiat on kirjeldatud ammendavalt (1, 2). Toksilisuskatsetes kasutatakse üldiselt parasvöötmele iseloomulikküürlemmelt (*Lemna gibba*) ja väikest lemmelt (*Lemna minor*). Mõlemal liigil on vee pinnal või vee sees ujuv litrikesetaoline vars (tallusjas võsu) ja iga tallusja võsu alakülje keskkoha külge kinnitunud väga peenike juur. Lemled õitsevad harva ja paljunevad peamiselt vegetatiivselt uute tallusjate võsude moodustamise abil (3). Vanemate taimedega võrreldes on noored taimed heledamad, lühemate juurtega ja koosnevad kahest või kolmest erineva suurusega tallusjast võsust. Tänu lemle väiksusele, lihtsale ehitusele, mittesugulisele paljunemisele ja lühikesele generatsiooniajale sobivad selle perekonna taimed väga hästi laboratoorseteks katseteks (4, 5).

Kuna tundlikkus uuritava aine suhtes on tõenäoliselt liigiti erinev, saab aineid võrrelda ainult ühe liigiga tehtud katsete alusel.

Näiteid lemle liikide kasutamise kohta katsetes: viited

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. 8pp.

Association Française de Normalisation (AFNOR). (1996). XP T 90–337: Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10pp.

Swedish Standards Institute (SIS). (1995). Water quality – Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor*, duckweed. SS 02 82 13. 15pp. (in Swedish).

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. 8pp.

Lemna paucicostata: Nasu, Y., Kugimoto, M. (1981). *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution. I. The sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 10:1959–1969.

Lemna perpusilla: Clark, J. R. et al. (1981). Accumulation and depuration of metals by duckweed (*Lemna perpusilla*). Ecotoxicol. Environ. Saf., 5:87–96.

Lemna trisulca: Huebert, D. B., Shay, J. M. (1993). Considerations in the assessment of toxicity using duckweeds. Environ. Toxicol. and Chem., 12:481–483.

▼ **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.

Lemna liikide kollektsoonid

University of Toronto Culture Collection of Algae and Cyanobacteria
 Department of Botany, University of Toronto
 Toronto, Ontario, Canada, M5S 3 B2
 Tel: +1 4169783641
 Faks: +1 4169785878
 e-post: 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
 Faks +46 86747636

Federal Environmental Agency (UBA)
 FG III 3.4
 Schichauweg 58
 12307 Berlin
 Germany
 e-post: lemna@uba.de
<http://www.umweltbundesamt.de/contact.htm>

KIRJANDUS

- 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*2. liide***Tüvikultuuri säilitamine**

Tüvikultuure võib pikemat aega säilitada madalal temperatuuril (4–10 °C), ilma et oleks vaja alustada uut kultiveerimist. Lemle toitelahus võib olla sama, mida kasutatakse katsetes, kuid tüvikultuuride puhul võib kasutada ka muid toitainerikkaid lahuseid.

Teatav arv noori helerohelisi taimi kantakse kindlate ajavahemike tagant aseptiliselt üle värsket toitelahust sisaldavasse nõusse. Käesolevas lisas soovitatud madala temperatuuri korral võib subkultuuride inokuleerimise vaheaeg olla kuni kolm kuud.

Kasutatakse keemiliselt puhtaid (happega pestud) steriilseid klaasist kultiveerimisnõusid ja aseptilist käitlustehnikat. Kui tüvikultuur saastub näiteks vetikate või seentega, tuleb võtta meetmeid saasteorganismide kõrvaldamiseks. Vetikate ja enamiku muude saastavate organismide korral võib seda saavutada pindmise steriliseerimise abil. Saastatud taimmaterjalist võetakse proov ja lõigatakse ära taimede juured. Materjali loksutatakse tugevasti puhtas vees ja see asetatakse 30 sekundiks kuni 5 minutiks 0,5-mahuprotsendilisse naatriumhüpokloriti lahusesse. Seejärel loputatakse taimmaterjali steriilse veega ja kantakse siis mitme portsjonina värsket toitelahust sisaldavatesse kultiveerimisnõudesse. Sellise töötlemise tagajärjel surevad paljud tallusjad võsud, eriti kui töötlemisaeg on pikem, kuid üksikud ellujäänud tallusjad võsud on tavaliselt saasteorganismidest vabad. Neid tallusjaid võsud võib kasutada uute kultuuride inokuleerimiseks.

▼ **M1**

3. liide

Toitelahused

Väikese lemle ja küürlemle jaoks soovitatakse erinevaid toitelahuseid. Väikese lemle puhul soovitatakse kasutada Rootsi standardi (SIS) kohase toitelahuse modifikatsiooni, samas kui küürlemle puhul soovitatakse kasutada toitelahust 20X-AAP. Järgnevalt on esitatud mõlema toitelahuse koostised. Nende toitelahuste valmistamiseks kasutatakse analüütiliselt puhtaid reaktiive ja deioniseeritud vett.

Rootsi standardi (SIS) kohane lemle toitelahus

- I–V põhilahus steriliseeritakse autoklaavimise (120 °C, 15 minutit) või membraanfiltrimise (pooride läbimõõt ligikaudu 0,2 µm) abil.
- VI põhilahus (ja mittekohustuslik VII põhilahus) steriliseeritakse membraanfiltrimise abil, neid lahuseid ei autoklaavita.
- Steriilseid põhilahuseid hoitakse jahedas kohas valguse juurdepääsuta. I–V põhilahus visatakse ära kuus kuud pärast valmistamist; VI põhilahuse (ja mittekohustusliku VII põhilahuse) säilimisaeg on üks kuu.

Põhilahus nr	Koostisaine	Sisaldus põhilahuses (g·l ⁻¹)	Sisaldus toitelahuses (mg·l ⁻¹)	Toitelahus	
				Element	Sisaldus (mg·l ⁻¹)
I	NaNO ₃	8,50	85	Na; N	32; 14
	KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	K; P	6,0; 2,4
II	MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	Mg; S	7,4; 9,8
III	CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	Ca; Cl	9,8; 17,5
IV	Na ₂ CO ₃	4,0	20	C	2,3
V	H ₃ BO ₃	1,0	1,00	B	0,17
	MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,20	0,20	Mn	0,056
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,010	0,010	Mo	0,0040
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050	0,050	Zn	0,011
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,0050	0,0050	Cu	0,0013
	Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,010	0,010	Co	0,0020
VI	FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,17	0,84	Fe	0,17
	Na ₂ -EDTA·2H ₂ O	0,28	1,4	—	—
VII	MOPS (puhver)	490	490	—	—

- Ühe liitri SIS toitelahuse saamiseks lisatakse 900 ml deioniseeritud veele järgmised komponendid:
 - 10 ml I põhilahust;
 - 5 ml II põhilahust;
 - 5 ml III põhilahust;
 - 5 ml IV põhilahust;

▼ **M1**

- 1 ml V põhilahust;
- 5 ml VI põhilahust;
- 1 ml VII põhilahust (mittekohustuslik).

Märkus. Täiendav VII põhilahus (MOPS puhver) võib olla vajalik teatavate uuritavate ainete puhul (vt punkt 1.4, viimane lõik).

- 0,1 või 1 M HCl või NaOH lisamisega reguleeritakse pH väärtusele $6,5 \pm 0,2$ ja lahuse maht viiakse deioniseeritud veega ühe liitrini.

Toitelahus 20X-AAP

Põhilahuste valmistamiseks kasutatakse steriilset destilleeritud või deioniseeritud vett.

Steriilseid põhilahuseid hoitakse jahedas kohas valguse juurdepääsuta. Nendes tingimustes on põhilahuste säilimisaeg vähemalt 6–8 nädalat.

Toitelahuse 20X – AAP viie põhilahuse (A1, A2, A3, B, C) valmistamiseks kasutatakse keemiliselt puhtaid kemikaale. Toitelahuse saamiseks lisatakse ligikaudu 850 ml deioniseeritud veele 20 ml iga põhilahust. 0,1 või 1 M HCl või NaOH lisamisega reguleeritakse pH väärtusele $7,5 \pm 0,1$ ja lahuse maht viiakse deioniseeritud veega 1 liitrini. Seejärel filtritakse toitelahus läbi ligikaudu 0,2 µm pooridega membraanfiltrit steriilsesse nõusse.

Katses kasutamiseks ette nähtud toitelahus tehakse valmis 1–2 päeva enne kasutamist, et pH saaks stabiliseeruda. Enne kasutamist kontrollitakse toitelahuse pH ja reguleeritakse seda vajaduse korral uuesti 0,1 või 1 M NaOH või HCl lisamisega eespool kirjeldatud viisil.

Põhilahus nr	Koostisaine	Sisaldus põhilahuses ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$) (*)	Sisaldus toitelahuses ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) (*)	Toitelahus	
				Element	Sisaldus - (*) ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$)
A1	NaNO_3	26	510	Na; N	190; 84
	$\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12	240	Mg	58,08
	$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4	90	Ca	24,04
A2	$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15	290	S	38,22
A3	$\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1,4	30	K; P	9,4; 3,7
B	H_3BO_3	0,19	3,7	B	0,65
	$\text{MnCl}_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,42	8,3	Mn	2,3
	$\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,16	3,2	Fe	0,66
	$\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,30	6,0	—	—
	ZnCl_2	$3,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	$66 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Zn	$31 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
	$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	$1,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	$29 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Co	$7,1 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$7,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	$145 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Mo	$58 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
	$\text{CuCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$0,012 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$	$0,24 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$	Cu	$0,080 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$
C	NaHCO_3	15	300	Na; C	220; 43

(*) Kui ei ole märgitud teisiti.

▼ **M1**

Märkus. Teoreetiliselt vajalik vesinikkarbonaadi lõppsisaldus (mille puhul ei ole vaja märkimisväärselt reguleerida pH-d) ei ole 300 mg/l, vaid 15 mg/l. Varem, kaasa arvatud laboratooriumidevahelistes võrdluskatsetes, on siiski kasutatud toitelahust 20X-AAP, mille vesinikkarbonaadisisaldus on 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.

Steinbergi toitelahus (vastab standardile ISO 20079)*Koostisainete sisaldus ja põhilahused*

- Standardis ISO 20079 nähakse modifitseeritud Steinbergi toitelahuse kasutamine ette ainult väikese lemle, *Lemna minor*'i puhul (kuna üksnes väikest lemmelt seal lubatakse kasutada), kuid katsed näitavad, et selle toitelahusega võib saada häid tulemusi ka küürlemle, *Lemna gibba* puhul.
- Toitelahuse valmistamiseks kasutatakse keemiliselt või analüütiliselt puhtaid kemikaale ja deioniseeritud vett.
- Toitelahuse valmistamiseks kasutatakse põhilahuseid või 10 korda kontsentreritumat toitelahust (see on kõrgeim kontsentratsioon, mille puhul koostisained veel ei sadestu).

Tabel 1

Stabiliseeritud pH-ga Steinbergi toitelahus (Altenburgeri modifikatsioon)

Koostisaine		Toitelahus	
Makroelemendid	molekulmass	mg/l	mmol/l
KNO ₃	101,12	350,00	3,46
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	236,15	295,00	1,25
KH ₂ PO ₄	136,09	90,00	0,66
K ₂ HPO ₄	174,18	12,60	0,072
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,37	100,00	0,41
Mikroelemendid	molekulmass	µg/l	µmol/l
H ₃ BO ₃	61,83	120,00	1,94
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,43	180,00	0,63
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	241,92	44,00	0,18
MnCl ₂ · 4H ₂ O	197,84	180,00	0,91
FeCl ₃ · 6H ₂ O	270,21	760,00	2,81
EDTA-dinaatriumdihüdraat	372,24	1 500,00	4,03

▼ **M1**

Tabel 2

Põhilahused (makroelemendid)

1. Makroelemendid (50-kordselt kontsentreeritud)	g/l
<i>Põhilahus 1:</i>	
KNO ₃	17,50
KH ₂ PO ₄	4,5
K ₂ HPO ₄	0,63
<i>Põhilahus 2:</i>	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	5,00
<i>Põhilahus 3:</i>	
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	14,75

Tabel 3

Põhilahused (mikroelemendid)

2. Mikroelemendid (1 000-kordselt kontsentreeritud)	mg/l
<i>Põhilahus 4:</i>	
H ₃ BO ₃	120,0
<i>Põhilahus 5:</i>	
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	180,0
<i>Põhilahus 6:</i>	
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	44,0
<i>Põhilahus 7:</i>	
MnCl ₂ · 4H ₂ O	180,0
<i>Põhilahus 8:</i>	
FeCl ₃ · 6H ₂ O	760,00
EDTA-dinaatriumdihüdraat	1 500,00

— Põhilahused 2 ja 3 võib kokku valada, samuti võib kokku valada ka põhilahused 4–7 (arvestades vajalikke kontsentratsioone).

— Säilimisaja pikendamiseks autoklaavitakse põhilahused 121 °C juures 20 minuti jooksul või steriliseeritakse membraanfiltrimisega (0,2 µm). Põhilahus 8 soovitatatakse kindlasti steriliseerida membraanfiltrimisega (0,2 µm).

Vajaliku lõppkontsentratsiooniga modifitseeritud Steinbergi toitelahuse valmistamine

— Ligikaudu 900 ml deioniseeritud veele (et vältida sadestumist) lisatakse à 20 ml põhilahuseid 1, 2 ja 3 (vt tabel 2).

— Lisatakse à 1,0 ml põhilahuseid 4, 5, 6, 7 ja 8 (vt tabel 3).

— Toitelahuse pH peab olema 5,5 ± 0,2 (pH reguleerimiseks lisatakse väiksem vajalik kogus NaOH või HCl lahust).

▼ M1

- Toitelahuse maht viiakse veega 1 000 milliliitrini.
- Kui põhilahused on steriilsed ja kasutatakse nõuetekohast vett, ei ole lahust vaja täiendavalt steriliseerida. Kui valmis lahust steriliseeritakse, siis lisatakse põhilahus 8 pärast autoklaavimist (121 °C, 20 minutit).

Pikemaks säilitamiseks mõeldud 10-kordse kontsentratsiooniga modifitseeritud Steinbergi toitelahuse valmistamine

- Ligikaudu 30 ml deioniseeritud veele (et vältida sadestumist) lisatakse à 20 ml põhilahuseid 1, 2 ja 3 (vt tabel 2).
- Lisatakse à 1,0 ml põhilahuseid 4, 5, 6, 7 ja 8 (vt tabel 3). Lahuse maht viiakse veega 100 milliliitrini.
- Kui põhilahused on steriilsed ja kasutatakse nõuetekohast vett, ei ole lahust vaja täiendavalt steriliseerida. Kui valmis lahust steriliseeritakse, siis lisatakse põhilahus 8 pärast autoklaavimist (121 °C, 20 minutit).
- Lõppkontsentratsiooniga lahuse pH peab olema $5,5 \pm 0,2$.

▼ **M4****C.27. SETTE-VEE MÜRGISUSKATSE SURUSÄÄSKLASTEL
RIKASTATUD SETTE KASUTAMISEGA****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 218 (2004). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata pikaajalise kemikaalidega kokkupuute mõju setetes elavatele magevee kahetiivaliste (*Chironomus* sp.) vastsetele. See põhineb *Chironomus riparius*'e ja *Chironomus tentans*'i kohta olemas olevatel mürgisuse määramise katse eeskirjadel, mis on koostatud Euroopas (1, 2, 3) ja Põhja-Ameerikas (4, 5, 6, 7, 8) ning mille puhul on tehtud laboritevahelised võrdluskatsed (1, 6, 9). Võib kasutada ka muid hästi dokumenteeritud surusääsklaste liike, näiteks *Chironomus yoshimatsui*'d (10, 11).
2. Käesolevas katsemeetodis kasutatav kokkupuutestenaarium on sette rikastamine uuritava kemikaaliga. Sobiva kokkupuutestenaariumi valimine oleneb katse kavandatud eesmärgist. Sette kemikaaliga rikastamise stsenaarium on kavandatud settes püsivate kemikaalide akumulatsioon tasemete simuleerimiseks. Käesolevas kokkupuutesüsteemis rikastatakse sette-vee katesüsteemis setet kemikaaliga.
3. Ained, mille kohta on vaja teha katsed settes elavate organismidega, jäävad tavaliselt sellesse keskkonda pikaks ajaks püsima. Settes elavad organismid võivad kemikaaliga mitmel viisil kokku puutuda. Iga kokkupuutete suhteline tähtsus ja aeg, mis on iga kokkupuutete puhul vajalik üldisse mürgisusse panuse andmiseks, sõltub asjaomase kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest. Tugevasti adsorbeeruvate ainete (näiteks $\log K_{ow} > 5$) või settega kovalentseid sidemeid moodustavate ainete puhul võib tähtis kokkupuutete olla manustamine saastunud toiduga. Väga lipofiilsete ainete mürgisuse alahindamiseks võib kaaluda settele sööda lisamist enne uuritava aine kasutamist. Kõigi võimalike kokkupuutete arvessevõtmiseks on käesolevas katsemeetodis keskendunud pikaajalisele kokkupuutele. *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* puhul kestab katse 20–28 päeva ning *C. tentans*'i puhul 28–65 päeva. Kui konkreetsel põhjusel vajatakse andmeid lühema aja kohta, näiteks ebastabiilse kemikaali mõju uurimiseks, võib kümnapäevase ajavahemiku järel võtta täiendavad paralleelproovid.
4. Mõõdetavad näitajad on vastsetest arenenud valmikute koguarv ja nende arenemiseks vajalik aeg. Vastsete elulemust ja kasvu soovitatakse mõõta alles pärast kümnapäevase ajavahemiku möödumist; kui lisaks vajatakse andmeid lühema aja kohta, kasutatakse vajaduse korral täiendavaid paralleelkatseid.
5. Soovitatakse kasutada spetsiaalselt koostatud setet. Spetsiaalselt koostatud settel on loodusliku sette ees mitmeid eeliseid:
 - väheneb katsete hajuvus, kuna nii saadakse reprodutseeritav standardiseeritud maatriks ning kõrvaldatakse vajadus saastumata ja puhaste setteallikate leidmiseks;
 - katseid võib alustada ükskõik millal, ei tule arvestada katse setete hooajalist muutlikkust ja setet ei ole vaja eeltöödelda kohaliku fauna kõrvaldamiseks; spetsiaalselt koostatud sette kasutamine vähendab samuti korrapäraseks katsetamiseks kohapeal piisavas koguses sette kogumisega seotud kulusid;
 - spetsiaalselt koostatud sette kasutamine võimaldab mürgisust võrrelda ja selle põhjal aineid järjestada.
6. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

▼ **M4**

KATSE PÕHIMÕTE

7. Kõigepealt puutuvad surusääsklaste esimese kasvujärgu vastsed kokku sette-vee süsteemis teatavas kontsentratsioonivahemikus oleva uuritava kemikaaliga. Uuritavat ainet lisatakse settesse ja esimese kasvujärgu vastsed lisatakse seejärel katsenõudesse, milles kontsentratsioonid settes ja vees on tasakaalustunud. Katse lõpus mõõdetakse surusääsklaste väljaarenemise määra ja arengu kiirust. Vastsete elulemust ja massi võidakse vajaduse korral mõõta ka kümne päeva möödumisel (kasutades vajaduse korral täiendavaid paralleelkatseid). Neid andmeid analüüsitakse kas regressioonimudeli abil, et hinnata kontsentratsioon, mis põhjustab valmikute väljaarenemise või vastsete elulemuse või kasvu x % vähenemise (näiteks EC_{15} , EC_{50} jne), või kasutades täheldatava toimeta kontsentratsiooni / vähima täheldatava toimega kontsentratsiooni määramiseks statistilise hüpoteesi testimise meetodit. Viimati nimetatud juhul tuleb täheldatud mõju väärtusi võrrelda statistiliste testide abil kontrollkatses määratud väärtustega.

ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

8. Teada peaks olema uuritava aine lahustuvus vees, aururõhk, mõõdetud või arvutatud jaotumine settesse ning stabiilsus vees ja settes. Kättesaadav peaks olema usaldusväärne analüüsimeetod uuritava aine kvantitatiivseks määramiseks katvas veekihi, poorivees ja settes; meetodi täpsus ja määramispiir peaksid olema teada. Kasulik on teada uuritava aine struktuurivalemit ja puhust. Samuti on kasulik teada uuritava aine keemilist käitumist (näiteks hajumine, abiootiline ja biootiline lagunemine jne). Täiendavad juhised selliste ainete mõju uurimiseks, mille füüsikalise-keemilised omadused raskendavad selle katse tegemist, on esitatud väljaandes (12).

VÕRDLUSKEMIKAALID

9. Katse-eeskirjade ja -tingimuste täitmise usaldusväärsuse tagamiseks võib korrapäraselt katsetada võrdluskemikaale. Laboritevahelistes võrdlustes ja valideerimisuuringutes edukalt kasutatud võrdlustoksikandid on näiteks lindaan, trifluraliin, pentaklorofenool, kaadmiumkloriid ja kaaliumkloriid (1, 2, 5, 6, 13).

KATSE KEHTIVUS

10. Katse kehtivuse tõendamisel arvestatakse järgmist:
- kontrollnõus peab katse lõpuks välja arenema vähemalt 70 % putukaid (1, 6);
 - *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* valmikud peaksid kontrollnõudes välja arenema 12–23 päeva jooksul pärast nende viimist nõudesse; *C. tentans*'i puhul on vajalik ajavahemik 20–65 päeva;
 - katse lõpus tuleks igas nõus mõõta pH ja lahustunud hapniku kontsentratsioon. Hapnikukontsentratsioon peaks olema vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadud väärtusest kasutataval temperatuuril ja katva veekihi pH peaks kõigis katsenõudes olema vahemikus 6–9;
 - vee temperatuur ei tohiks erineda rohkem kui $\pm 1,0$ °C võrra. Vee temperatuuri on võimalik kontrollida isotermilise ruumi abil ja sel juhul peaks ruumi temperatuur olema sobivate ajavahemike järel kinnitatud.

▼ **M4****MEETODI KIRJELDUS****Katsenõud**

11. Uuring tehakse 600 ml klaasist katsenõudega, mille läbimõõt on 8 cm. Muud nõud on sobivad, kuid need peaksid tagama katva veekihi ja sette vajaliku paksuse. Sette pind peaks olema piisav, et tagada vastse kohta 2–3 cm². Settekihi paksuse ja katva veekihi paksuse suhe peaks olema 1 : 4. Katsenõud ja muud seadmed, mis katsesüsteemiga kokku puutuvad, peaksid olema valmistatud täies ulatuses klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist (näiteks teflonist).

Liigi valimine

12. Katses kasutatav liik on eelistatavalt *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* on samuti sobiv, aga selle käsitlemine on keerukam ja see nõuab pikemat katseperioodi. *Chironomus yohimatsui* kasutamine on samuti võimalik. 2. liites on esitatud andmed *Chironomus riparius* 'e kultuuri kasvatamise meetodite kohta. Ka muude liikide, nagu *Chironomus tentans* 'i (4) ja *Chironomus yohimatsui* (11) kultuuri kasvatamise tingimused on avaldatud. Enne katset tuleb kinnitada liigi määramist, aga seda ei nõuta enne iga katset, kui organismid pärinevad asutusesisest kultuurist.

Sete

13. Eelistatavalt tuleks kasutada spetsiaalselt koostatud setet (mida nimetatakse ka taastatud, tehnilikuks või sünteetiliseks setteks). Loodusliku sette kasutamise korral tuleks seda iseloomustada (vähemalt pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, samuti on soovitatav määrata muud parameetrid, nagu süsiniku-lämmastiku suhe ja granulomeetria) ning selles ei tohiks olla mingeid saasteaineid ega muid organisme, kes võiksid surusääsklastega konkureerida või neid süüa. Enne loodusliku sette kasutamist surusääsklastel avalduva mürgisuse katses on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus. Käesolevas katses soovatakse kasutada järgmist spetsiaalselt koostatud setet, mis põhineb katsemeetodis C.8 (14) kasutataval tehismullal (1, 15, 16):

- a) 4–5 % (kuivmass) turvast: pH väärtus võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0; tähtis on kasutada peeneks jahvatatud (osakese suurus ≤ 1 mm) pulbrilist turvast, mida on kuivatatud ainult õhu käes;
- b) 20 % (kuivmass) kaoliinsavi (kaoliiniisisaldus eelistatavalt üle 30 %);
- c) 75–76 % (kuivmass) kvartsiiva (see peaks peamiselt koosnema peenest liivast ja rohkem kui 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 µm);
- d) lõplikus segus niiskusesisalduse 30–50 % saamiseks lisatakse deioniseeritud vett;
- e) sette lõpliku segu reguleerimiseks pH vahemikku 7,0 ± 0,5 lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati (CaCO₃). Lõpliku segu orgaanilise süsiniku sisaldus peaks olema 2 % (±0,5 %) ja see tuleks õigeks seada sobivas koguses turba ja liiva kasutamisega kooskõlas alapunktidega a ja c.

14. Turba, kaoliinsavi ja liiva päritolu peaks olema teada. Sette koostisosi tuleks kontrollida, et tõendada keemilise saaste puudumine (näiteks raskmetallid, kloororgaanilised ühendid, fosfororgaanilised ühendid jne). Spetsiaalselt koostatud sette valmistamise näidis on esitatud 3. liites. Kuivade koostisosade segamine on samuti lubatav, kui tõendatakse, et pärast katva veekihi lisamist ei toimu sette koostisosade eraldumist (näiteks turbaosakeste hõljumist) ja et turvas või sete on piisavalt konditsioneerunud.

▼ M4**Vesi**

15. Katseveeks sobib vesi, mis vastab 2. ja 4. liites esitatud lahendamiseks kasutatava vee nõutavatele keemilistele omadustele. Kasvuveena ja katseveena lubatakse kasutada iga sobivat vett, looduslikku vett (pinna- või põhjavesi), taastatud vett (vt 2. liide) või dekloritud kraanivett, kui surusääsklased jäävad selles kasvatamise ja katsetamise ajal ellu ega ilmuta stressi tunnuseid. Katse alguses peaks katsevee pH olema vahemikus 6–9 ja vee summaarne karedus ei tohiks olla suurem kui 400 mg/l CaCO₃-na. Kui oletatakse karedust tekitavate ionide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada siiski väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks sel juhul kasutada Elendti kasvukeskkonda M4). Kogu uuringu vältel tuleks kasutada sama tüüpi vett. 4. liites loetletud vee kvaliteedi omadusi tuleks mõõta vähemalt kaks korda aastas või siis, kui kahtlustatakse, et kõnealused omadused võivad olla oluliselt muutunud.

Põhilahused – rikastatud setted

16. Tavaliselt valmistatakse valitud kontsentratsiooniga rikastatud setted uuritava aine lahuse otse settesse lisamise teel. Deioniseeritud vees lahustatud uuritava aine põhilahus segatakse spetsiaalselt koostatud settega rullimisseadme või söodasegaja abil või käsitsi. Veet halvasti lahustuva uuritava aine võib lahustada võimalikult väikses sobiva orgaanilise lahusti (näiteks heksaan, atsetoon või kloroform) koguses. See lahus segatakse ühes katsenõus seejärel 10 g peene kvartslüüvaga. Lahustil lastakse auruda ja see tuleb liivast täielikult kõrvaldada; seejärel segatakse liiv katsenõu jaoks sobivas koguses settega. Uuritava aine solubiliseerimiseks, dispergeerimiseks või emulgeerimiseks võib kasutada ainult kergesti lenduvaid aineid. Tuleks meeles pidada, et sette valmistamisel tuleb arvesse võtta uuritava aine ja liiva segust pärit liiva (s.o sete tuleks siis valmistada väiksema liivakogusega). Tuleks hoolitseda, et settele lisatud uuritav aine oleks settes põhjalikult ja ühtlaselt jaotatud. Vajaduse korral võib homogeensuse taseme määramiseks analüüsida alamproove.

KATSE KAVANDAMINE

17. Katse kavandamine hõlmab katse kontsentratsioonide arvu ja vahemike valimist, iga kontsentratsioonitaseme jaoks nõude arvu ning igas nõus olevate vastsete arvu valimist. Kirjeldatud on, kuidas hinnata EC-punktide väärtusi ja täheldatava toimeta kontsentratsiooni ning teha piirsalduskatset.

Regressioonanalüüsi kavandamine

18. Katses kasutatavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama toimet avaldavat kontsentratsiooni (nt EC₁₅, EC₅₀) ja uuritava aine puhul huvi pakkuvat kontsentratsioonivahemikku. Tavaliselt paraneb toimet avaldavate kontsentratsioonide (EC_x) hinnangute täpsus ja eelkõige kehtivus, kui toimet avaldav kontsentratsioon on uuritud kontsentratsioonide vahemikus. Tuleks vältida suurt ekstrapoleerimist allapoole väikseimat positiivset kontsentratsiooni või ülespoole suuremat kontsentratsiooni. Eelnev annusevahemiku leidmise katse aitab valida kasutatavat kontsentratsioonivahemikku (vt punkt 27).

▼ **M4**

19. Kui tuleb hinnata EC_{50} , tuleks katse teha vähemalt viie kontsentratsiooniga ja iga kontsentratsiooni kohta tuleks kasutada kolme paralleelkatset. Igal juhul on mudeli korraliku hindamise jaoks soovitatav kasutada piisavaid uuritavaid kontsentratsioone. Kontsentratsioonidevaheline kordaja ei tohiks olla suurem kui 2 (erandi võib teha juhul, kui doosi mõju graafiku tõus on madal). Iga doosi paralleelkatsete arvu võib vähendada, kui suurendatakse eri mõjuga uuritavate kontsentratsioonide arvu. Paralleelkatsete arvu suurendamine või uuritavate kontsentratsioonide vahemiku vähendamine enamasti vähendab usaldusvahemikku. Kui on vaja hinnata vastsete elulemust ja kasvu kümne päeva järel, on vaja võtta täiendavaid paralleelproove.

Täheldatava toimeta kontsentratsiooni / vähima täheldatava toimega kontsentratsiooni hindamise kavandamine

20. Kui hinnatakse täheldatava toimeta kontsentratsiooni või vähimat täheldatava toimega kontsentratsiooni, tuleks kasutada viit uuritavat kontsentratsiooni vähemalt nelja paralleelkatsega ja kõnealuseid kontsentratsioone eraldav kordaja ei tohiks olla suurem kui 2. Paralleelkatsete arv peaks olema piisav, et tagada piisav statistiline võimsus, et tuvastada katse- ja kontrollseadme tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ($p = 0,05$). Arengu kiiruse puhul on üldiselt asjakohane variatsioonanalüüs (ANOVA), näiteks Dunnetti test ja Williamsi test (17, 18, 19, 20). Väljaarenemise suhte puhul võib kasutada Cochran-Armitage'i testi, Fisheri täpset testi (Bonferroni parandusega) või Manteli-Haenszeli testi.

Piirsalduskatse

21. Kui esialgsetes annusevahemiku leidmise katsetes tulemusi ei saadud, võib teha piirsalduskatse (üks katsekonsentratsioon ja kontroll). Piirsalduskatse eesmärk on teha katse kontsentratsioonil, mis on piisavalt suur, et otsustajad võiksid uuritava aine mürgisuse välistada, ning piirsalduseks võetakse kontsentratsioon, mida eeldatavasti üheski olukorras ei teki. Soovitatakse kasutada 1 000 mg/kg (kuivmass). Enamasti tuleb nii töötlus- kui ka kontrollseadmetega teha vähemalt kuus paralleelkatset. Tuleks tõendada piisava statistilise võimsuse olemasolu, et tuvastada katse- ja kontrollseadme tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ($p = 0,05$). Mõõdetavate suuruste (arengu kiirus ja kaal) puhul, kui andmed vastavad käesoleva katse nõuetele (normaalsus, ühtlane hajumine), on asjakohane statistiline meetod t-kriteerium. Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada mitteõrdse hajumise t-kriteeriumi või mitteparameetrilist testi, näiteks Wilcoxon-Manni-Whitney testi. Valmikute väljaarenemise suhte puhul on asjakohane kasutada Fisheri täpset testi.

KATSE KÄIK

Kokku puutetingimused

Rikastatud sette-vee süsteemi valmistamine

22. Uuritavate ainete lisamiseks soovitatatakse kasutada rikastamismeetodit, mida on kirjeldatud katsemeetodis C.8 „Toksilisus vihmaussidele” (14). Rikastatud setted asetatakse nõudesse ja neile lisatakse kattevee veekiht, et saada sette-vee ruumala suhe 1 : 4 (vt punktid 11 ja 15). Settekihi paksus peaks olema 1,5–3 cm. Sette osade eraldumise ja veesambas katsevee lisamisel peene materjali uue suspensiooni tekkimise vältimiseks võib sette katta vee valamise ajal plastikkettaga, mis pärast vee valamist kohe eemaldatakse. Võib kasutada ka muid võtteid.
23. Katsenõud peaksid olema kaetud (näiteks klaasplaadiga). Vajaduse korral lisatakse vee aurumise kompenseerimiseks ja uuringu algse veetaseme saavutamiseks vett. Soolade kogunemise vältimiseks tuleks lisada destilleeritud või deioniseeritud vett.

▼ **M4***Püsikindluse tagamine*

24. Kui rikastatud sete koos katva veekihiga on valmistatud, on soovitatav lasta uuritava kemikaalil jaotuda vee ja sette vahel (3, 4, 6, 13). Seda tuleks eelistatavalt teha katses kasutatavates temperatuuri- ja õhustustingimustes. Vajalik tasakaalustumisaeg sõltub settest ja kemikaalidest ning võib kesta tunde, päevi ja harvadel juhtudel isegi kuni mitu nädalat (4–5 nädalat). Kuna paljud kemikaalid võivad sellise aja jooksul laguneda, ei oodata tasakaaluoleku teket, vaid soovitatakse 48-tunnist tasakaalustamise ajavahemikku. Kõnealuse täiendava tasakaalustamise ajavahemiku lõpus tuleks mõõta uuritava aine kontsentratsioon katvas veekihis, poorivees ja settes vähemalt suurimal ja väiksemal kontsentratsioonil (vt punkt 38). Need uuritava aine analüütilised määramised võimaldavad arvutada massitasakaalu ja väljendada tulemusi mõõdetud kontsentratsioonide alusel.

Katseorganismide lisamine

25. Neli kuni viis päeva enne katseorganismide lisamist katsenõudesse tuleks võtta kultuuridest munamassid ja asetada need väikestesse nõudesse kultuuri kasvukeskkonnas. Võib kasutada varukultuuri vana kasvukeskkonda või värskest valmistatud kasvukeskkonda. Viimati nimetatul kasutamisel tuleks lisada kultuuri kasvukeskkonnale väikses koguses sööta, näiteks rohevetikaid ja/või paar tilka peeneks jahvatatud helbelise kalasööda suspensiooni filtraadist (vt 2. liide). Tuleks kasutada ainult värskest munetud munamasse. Tavaliselt hakkavad vastsed kooruma paari päeva möödumisel munade munemisest (2–3 päeva *Chironomus riparius*'e puhul temperatuuril 20 °C ning 1–4 päeva *Chironomus tentans*'i puhul temperatuuril 23 °C ja *Chironomus yoshimatus* puhul temperatuuril 25 °C) ja vastsed kasvavad neljas kasvujärgus, millest iga kasvujärk kestab 4–8 päeva. Katses tuleks kasutada esimese kasvujärgu vastseid (2–3 või 1–4 päeva pärast koorumist). Sääskede kasvujärke on võimalik kontrollida peapksli laiuse mõõtmisega (6).
26. Tõmbi pipeti abil jaotatakse 20 esimese kasvujärgu vastset juhuslikult igasse katsenõusse, mis sisaldavad rikastatud setet ja vett. Vee aereerimine tuleb vastsete katsenõudesse lisamise ajal peatada ja seda ei jätkata 24 tunni vältel pärast vastsete lisamist (vt punktid 25 ja 32). Kasutatava katsekava kohaselt (vt punktid 19 ja 20) on kasutatud vastsete arv kontsentratsiooni kohta toimet avaldava kontsentratsiooni (EC-punkti) hindamise korral vähemalt 60 ja täheldatava toimeteta kontsentratsiooni määramise korral 80.

Uuritavad kontsentratsioonid

27. Annusevahemiku leidmise katse võib aidata kindlaks teha lõpliku katse kontsentratsioonivahemikke. Selleks kasutatakse uuritava aine laiate vahedega kontsentratsioonide seeriat. Lõplikus katses kasutatavaga sama pindtiheduse tagamiseks iga surusääsklase kohta puutuvad surusääsklased kokku uuritava aine iga kontsentratsiooniga sellise ajavahemiku vältel, mis võimaldab hinnata asjakohaseid katsekonsentratsioone; paralleelproovid ei ole vajalikud.
28. Lõpliku katse kontsentratsioonid määratakse kindlaks annusevahemiku leidmise katse tulemuse alusel. Tuleks kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni ja need tuleks valida nii, nagu on kirjeldatud punktides 18–20.

▼ **M4***Kontrollkatsed*

29. Katse peaks hõlmama vajalikku arvu paralleelseid settega kontrollkatse-nõusid, milles ei ole uuritavat ainet (vt punktid 19–20). Kui uuritava aine lisamiseks on kasutatud lahustit (vt punkt 16), siis tuleks teha settele lahusti lisamise kontrollkatse.

Katsesüsteem

30. Kasutatakse staatilisi süsteeme. Erandjuhul võib kasutada poolstaatilisi või läbivooluga süsteeme koos katva veekihi vahelduva või pideva uuendamisega, näiteks kui vee kvaliteet ei ole katseorganismile enam sobiv või mõjutab kemikaali tasakaaluolekut (näiteks lahustunud hapniku tase langeb liiga madalale, väljutatud saaduste kontsentratsioon muutub liiga suureks või settest leostuvad mineraalained, mis mõjutavad pH-d ja/või vee karedust). Tavaliselt on siiski piisavad ja eelistatavad muud katva veekihi kvaliteedi parandamise meetodid, näiteks aereerimine.

Sööt

31. Vastseid tuleb sööta eelistatavalt iga päev või vähemalt kolm korda nädalas. Kalasööta (suspensioon vees või peeneks jahvatatud sööt, näiteks TetraMin või TetraPhyll; vt andmed, 2. liide) koguses 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatoi* puhul) vastse kohta päevas näib olevat esimese kümne päeva jooksul noorte vastsete jaoks piisav. Vanemad vastsed võivad vajada mõnevõrra rohkem sööta: 0,5–1 mg vastse kohta päevas peaks olema piisav ülejäänud katse vältel. Söödakogust tuleks vähendada kõigi töötlemiste korral ja reguleerida, kui täheldatakse seente kasvu või kui kontrollkatses täheldatakse suremust. Kui seente kasvu ei ole võimalik peatada, tuleb katset korrata. Kui katseid tehakse tugevalt adsorbeeruva ainega (näiteks $\log K_{ow} > 5$) või settega kovalentseid sidemeid tekitava ainega, võib enne stabiliseerumise ajavahemikku lisada spetsiaalselt koostatud settele sellise söödakoguse, mis on vajalik organismide elulemuse ja loodusliku kasvu tagamiseks. Selleks tuleb kasutada kalasööda asemel taimset materjali, näiteks võib kasutada 0,5 % (kuivmass) kõrvenõgese (*Urtica dioica*), mooruspuu (*Morus alba*), valge ristiku (*Trifolium repens*), spinati (*Spinacia oleracea*) peeneks jahvatatud lehti või muud taimset materjali (*Cerophyl* või alfatseluloos).

Inkubeerimistingimused

32. Eelistatavalt 24 tundi pärast vastsete lisamist hakatakse katsenõudes katvat veekihti kergelt aereerima, mida jätkatakse kogu katse vältel (tuleb olla hoolikas, et lahustunud hapniku kontsentratsioon ei langeks alla 60 % hapniku küllastuskontsentratsioonist). Aereerimiseks kasutatakse klaasist Pasteuri pipetti, mis on kinnitatud settekihi kohale 2–3 cm kõrgusele (üks või mõni mull sekundis). Lenduva kemikaali katsetamisel võib kaaluda sette-vee süsteemi aereerimisest loobumist.
33. Katse tehakse püsival temperatuuril 20 °C (±2 °C). *C. tentans* i ja *C. yoshimatoi* puhul on soovitatavad temperatuurid vastavalt 23 °C ja 25 °C (±2 °C). Kasutatakse 16-tunnist valgustusperioodi ja valguse intensiivsus peaks olema 500 kuni 1 000 luksit.

▼M4*Kokkupuute kestus*

34. Kokkupuude algab vastsete lisamisega rikastatud ja kontrollnõudesse. Maksimaalne kokkupuute kestus on 28 päeva *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* puhul ning 65 päeva *C. tentans*'i puhul. Kui sääsed arenevad välja varem, võib katse lõpetada vähemalt viie päeva möödumisel pärast viimase valmiku väljaarenemist kontrollnõus.

Vaatlused*Väljaarenemine*

35. Tehakse kindlaks arengu aeg ning täielikult väljaarenenud isas- ja emassääskede koguarv. Isased on tänu sulgjatele tundlatele kergesti äratuntavad.
36. Katsenõusid tuleks vaadelda vähemalt kolm korda nädalas, et hinnata visuaalselt iga ebatavalist käitumist (näiteks settest väljumine, ebatavaline ujumine) kontrollnõuga võrreldes. Oodataval valmikute ilmumise ajal loendatakse sääski iga päev. Registreeritakse täielikult väljaarenenud sääskede sugu ja arv. Pärast tuvastamist kõrvaldatakse sääsed nõudest. Enne katse lõpetamist munetud munamassid tuleks registreerida ja seejärel eemaldada, et vältida settesse uute vastsete teket. Samuti registreeritakse nende nähtavate nukkude arv, millest sääsk ei koorunud. Suunised väljaarenemise mõõtmise kohta on esitatud 5. liites.

Kasvamine ja elulemus

37. Kui on vaja esitada andmeid vastsete elulemuse ja kasvu kohta kümne päeva jooksul, tuleks katset alustada suurema arvu nõudega, et neid oleks võimalik seejärel kasutada. Kõnealuste täiendavate nõude setteid söelutakse vastsete saamiseks 250 µm sõela abil. Surma tuvastamise kriteeriumid on liikumatus või reageerimatus mehaanilisele stiimulile. Vastsed, keda ei õnnestunud kätte saada, tuleks samuti surnuks lugeda (vastsed, kes surid katse alguses, võivad olla juba mikroobide poolt lagundatud). Tehakse kindlaks ellujäänud vastsete (tuhavaba) kuivmass katsenõu kohta ja arvutatakse keskmine individuaalne kuivmass nõu kohta. Kasulik on määrata, millisesse kasvujärku ellujäänud vastsed kuuluvad; selleks võib mõõta iga isendi peakapsli laiust.

Analüütilised mõõtmised*Uuritava aine kontsentratsioon*

38. Uuritava aine kontsentratsiooni analüütiliseks määramiseks settes võetakse sette proovid enne katse algust (s.o vastsete lisamist) vähemalt ühest nõust iga kokkupuutetaseme kohta. Soovitatakse, et katse alguses (vt punkt 24) ja lõpus analüüsitakse suurimal ja väikseimal kontsentratsioonil vähemalt katva veekihi, poorivee ja sette proove. Kõnealused uuritava aine kontsentratsiooni määramised annavad teavet uuritava aine käitumise/jaotumise kohta vee-sette süsteemis.
39. Kui tehakse vahepealseid mõõtmisi (näiteks seitsmendal päeval) või kui analüüsi jaoks on vaja suurt proovi, mida ei saa katsenõust ilma katsesüsteemi mõjutamata võtta, tuleks analüüs teha samal viisil töödeldud, kuid bioloogilisteks vaatlusteks mitte kasutatavast täiendavast katsenõust (kus on ka katseorganismid) võetud proovist.

▼ **M4**

40. Tsentrifugeerimine näiteks 10 000 g ja 4 °C juures 30 minuti vältel on soovitatav meetod poorivee eraldamiseks. Kui on tõendatud, et uuritav aine ei adsorbeeru filtriteel, võib sobida ka filtrimine. Mõnel juhul ei pruugi liiga väikse proovi suuruse tõttu olla võimalik poorivee kontsentratsiooni määramine.

Füüsikalised-keemilised parameetrid

41. Katsenõude pH-d ja temperatuuri (vt punkt 10) tuleks mõõta asjakohasel viisil. Katse alguses ja lõpus tuleks kontrollnõudes ja ühes suurima kontsentratsiooniga katsenõus mõõta karedust ja ammoniaaki.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

42. Kõnealuse katse eesmärk on teha kindlaks uuritava aine mõju isas- ja emas-sääskede arengu kiirusele ning täielikult välja arenenud sääskede koguarvule või kümnepäevase katse korral mõju vastsete elulemusele ja kehamassile. Kui puuduvad andmed sugude statistiliselt erineva tundlikkuse kohta, võib statistilistes analüüsidis isaste ja emaste tulemused koondada. Sugude erinevat tundlikkust on võimalik statistiliselt hinnata näiteks χ^2 -r \times 2 tabeli testi abil. Vajaduse korral tuleb kümne päeva möödumisel teha kindlaks vastsete elulemus ja keskmine individuaalne kuivmass nõu kohta.
43. Toimet avaldavad kontsentratsioonid, mis põhinevad kuivmassil ja väljendatakse kuivmassina, arvutatakse eelistatavalt katse alguses mõõdetud sette kontsentratsioonide alusel (vt punkt 38).
44. EC₅₀ või muu EC_x-näitaja arvutamiseks võib tegelike paralleelproovidena kasutada nõude statistikat. Iga EC_x usaldusvahemiku arvutamisel tuleks arvesse võtta eri nõude tulemuste hajumist või tuleks näidata, et kõnealune hajumine on nii väike, et seda võib eirata. Kui andmeid töödeldakse mudeli parameetrite leidmiseks vähimruutude meetodiga, tuleks nõu statistikat teisendada, et dispersioon oleks ühtlasem. EC_x-väärtused tuleks siiski arvutada pärast tulemuse esialgsele väärtusele tagasiteisendamist.
45. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha hüpoteesi katsetamise abil kindlaks täheldatava toimeta kontsentratsioon / vähim täheldatava toimega kontsentratsioon, tuleb võtta arvesse nõudevahelist hajuvust, näiteks kasutada hierarhilist dispersioonanalüüsi (*nested* ANOVA). Olukorras, kus tavapärased dispersioonanalüüsi (ANOVA) eeldused ei ole täidetud, võivad paremini sobida töökindlamad testid (21).

Väljaarenemise määr

46. Väljaarenemise määrad on kõik-või-mitte-midagi-andmed ja neid on võimalik analüüsida astmeliselt kohaldatava Cochran-Armitage'i testi abil, kus eeldatakse, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, ja need andmed on selle eeldusega kooskõlas. Vastasel juhul võib kasutada Fisher'i täpset testi või Manteli-Haenszeli testi Bonferroni-Holmi kohandatud p-väärtustega. Kui on tõendeid, et ühe kontsentratsiooniga paralleelproovide hajuvus on suurem, kui eeldatakse binoomjaotuse dispersiooni puhul (nn ekstra-binoomjaotuse dispersioon), tuleks kasutada töökindlat Cochran-Armitage'i või Fisher'i täpset testi, nagu on soovitatud (21).

▼ **M4**

Määratakse nõu kohta välja arenenud sääskede arv n_e , mis jagatakse lisatud vastsete arvuga n_a :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kus:

ER = väljaarenemise määr

n_e = nõu kohta välja arenenud sääskede arv

n_a = nõu kohta lisatud vastsete arv.

47. Ekstra-binoomjaotuse dispersiooni korral on suurte valimite puhul kõige asjakohasem alternatiiv käsitleda väljaarenemise määra pideva vastusena ning kasutada selliseid meetodeid nagu Williamsi test, kui võib eeldada, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, kui see on kooskõlas kõnealuste väljaarenemise määra andmetega. Kui monotoonsust ei ole, on asjakohane kasutada Dunnetti testi. Suur valim on siinkohal määratletud kui väljaarenenud sääskede arv ja väljaarenemata jäänud sääskede arv, mis mõlemad on suuremad kui viis paralleelproovi (nõu) kohta.
48. Dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetodite kohaldamiseks tuleks väljaarenemise määra väärtused kõigepealt teisendada arkussiinuse-ruutjuure-teisenduse või Freemani-Tukey teisenduse abil, et saada ligikaudne normaaljaotus ja võrdsustada variatsioonid. Cochran-Armitage'i testi, Fisheri täpse testi (Bonferroni) või Manteli-Haenszeli testi võib kasutada absoluutsete sageduste kasutamisel. Arkussiinuse-ruutjuure-teisendust kohaldatakse, arvutades väljaarenemise määra ruutjuure siinuse pöördarvu (\sin^{-1}).
49. Väljaarenemise määrade puhul arvutatakse EC_x -väärtused regressioonanalüüsi (või näiteks probit- (22) või logit-teisenduse, Weibulli meetodi, sobiva müügiloleva tarkvara jne) abil. Kui regressioonanalüüs ebaõnnestub (näiteks kui on vähem kui kaks osalist vastust), kasutatakse muid mitteparameetrilisi meetodeid, näiteks libisev keskmine või lihtne interpolatsioon.

Arengu kiirus

50. Keskmine arengu aeg on keskmine ajavahemik vastsete lisamise (katse päev 0) ja sääskede katsekohordi tekke vahel. (Tegelik arenguaja arvutamiseks tuleks arvesse võtta vastsete vanust lisamise ajal.) Arengu kiirus on pöördvõrdeline arengu ajaga (ühik: 1/päev) ja väljendab vastsete arengu seda osa, mis toimub ühe päeva jooksul. Kõnealuste sette mürgisuse hindamise uuringute puhul eelistatakse arengu kiirust, kuna selle dispersioon on väiksem, homogeensem kui arenguaja puhul ja lähedasem normaaljaotusele. Seega võib arengu kiiruse puhul kasutada tugevaid parameetrilisi testimismeetodeid, mida ei saa kasutada arenguaja puhul. Arengu kiiruse kui pideva vastuse jaoks saab EC_x -väärtusi hinnata regressioonanalüüsiga (näiteks 23, 24).
51. Järgmiste statistiliste testide puhul eeldatakse, et kontrolli päeval x täheldatud sääsed on välja arenenud keskmisel ajavahemikul päeva x ja päeva $x - 1$ vahel (l = kontrollimistevahelise ajavahemiku pikkus, tavaliselt üks päev). Keskmine arengu kiirus nõu kohta (\bar{x}) arvutatakse järgmise võrrandi alusel:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

▼ M4

kus:

\bar{x} – keskmine arengu kiirus nõu i kohta

i – kontrollivahemiku indeks

m – kontrollivahemike maksimaalne arv

f_i – kontrollivahemikul i välja arenenud sääskede arv

n_e – katse lõpuks välja arenenud sääskede koguarv ($=\sum f_i$)

x_i – ajavahemikul i välja arenenud sääskede arengu kiirus

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{day}_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

kus:

day_i (päev) – kontrolli päev (lisamisest möödunud päevade arv)

l_i – kontrolli vahemiku pikkus i (päevades, tavaliselt üks päev).

Katseprotokoll

52. Katseprotokollis tuleks esitada vähemalt järgmine teave.

Uuritav aine:

- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused (lahustuvus vees, aururõhk, jaotustegur mullas (või settes, kui see on määratud), stabiilsus vees jne);
- kemikaali tunnusandmed (üldkasutatav nimetus, keemiline nimetus, struktuurivalem, CASi number jne), sh puhtus ja uuritava aine kvantitatiivse analüüsi meetod.

Katseorganismi liik:

- kasutatud katseloom: liik, teaduslik nimetus, organismide päritolu ja kasvatustingimused;
- teave munamasside ja vastsete käsitlemise kohta;
- katseloomade vanus katsenõudesse sisestamise ajal.

Katsetingimused:

- kasutatud sete, s.o looduslik või spetsiaalselt koostatud sete;
- loodusliku sette puhul setteproovi võtmise koha asukoht ja kirjeldus, sh võimaluse korral saastumise ajalugu; omadused: pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, süsiniku-lämmastiku suhe ja granulomeetria (kui see on asjakohane);
- spetsiaalselt koostatud sette valmistamine: koostisosad ja omadused (orgaanilise süsiniku sisaldus, pH, niiskus jne katse alguses);
- katsevee valmistamine (kui kasutatakse taastatud vett) ja omadused (hapnikusisaldus, pH, elektrijuhtivus, karedus jne katse alguses);
- settekihi ja katva veekihi paksus;
- katva veekihi ja poorivee maht; märja sette kaal koos pooriveega ja ilma selleta;

▼ **M4**

- katsenõud (materjal ja suurus);
- sette rikastamise meetod: kasutatud uuritava kemikaali kontsentratsioonid, paralleelproovide arv ja lahusti kasutamine, kui seda tehti;
- rikastatud sette-vee süsteemi stabiliseerimise tasakaaluoleku faas; kestus ja tingimused;
- inkubatsioonitingimused: temperatuur, valgustusperiood ja valguse intensiivsus, aereerimine (sagedus ja intensiivsus);
- üksikasjalik teave söötmise kohta, sh sööda tüüp, valmistamine, kogus ja söötmise ajakava.

Tulemused:

- nominaalsed katsekonsentratsioonid, mõõdetud katsekonsentratsioonid ja kõigi nende analüüside tulemused, millega määrati uuritava aine kontsentratsiooni katsenõus;
- vee kvaliteet katsenõus, s.o pH, temperatuur, lahustunud hapnik, karedus ja ammoniaak;
- aurustunud katsevee asendamine, kui seda tehti;
- väljaarenenud isas- ja emassääskede arv iga nõu ja iga päeva kohta;
- iga nõu kohta nende vastsete arv, kellest sääski ei arenenud;
- vastsete keskmine individuaalne kuivmass iga nõu ja kasvujärgu kohta, kui see on asjakohane;
- valmikute väljaarenemise protsent iga paralleelproovi ja katsekonsentratsiooni kohta (isas- ja emassääsed kokku);
- täielikult välja arenenud sääskede keskmine arengu kiirus iga paralleelproovi ja katsekonsentratsiooni kohta (isas- ja emassääsed kokku);
- mürgisuse näitajate hinnangud, näiteks EC_x (ja selle usaldusvahemik), täheldatava toimeteta kontsentratsioon ja/või vähim täheldatava toimega kontsentratsioon ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;
- tulemuste arutelu, kaasa arvatud käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise võimalik mõju katsetulemustele.

KIRJANDUS

- 1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streløkke and H.Köpp. Berlin 1995.
- 2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- 3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- 4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM. International, West Conshohocken, PA.
- 5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.

▼ **M4**

- 6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.
- 7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- 8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- 9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, and Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyalella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- 10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.
- 11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. 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) Käesoleva lisa katsemeetod C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.
- 15) Suedel BC and JH Rodgers (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.
- 16) Naylor C and C Rodrigues (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.
- 17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc., 50: 1096–1121.
- 18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics, 20: 482–491.
- 19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics, 27: 103–117.
- 20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics, 28: 510–531.
- 21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48: 577–585.
- 22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.
- 23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11: 1485–1494.
- 24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼M4*1. liide***MÕISTED**

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse järgmisi mõisteid järgmises tähenduses:

spetsiaalselt koostatud sete (ehk taastatud, tehislik või sünteetiline sete) – selliste materjalide segu, mida kasutatakse loodusliku sette füüsiliste koostisosade imiteerimiseks;

kattev veekiht – vesi, mis pannakse katsenõus sette peale;

poorivesi – sette- või mullaosakeste vahelises ruumis olev vesi;

rikastatud sete – sete, millele on lisatud uuritavat ainet;

uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M4**

2. liide

Chironomus riparius'e kasvatamist käsitlevad soovitused

1. *Chironomus*'e vastseid võib kasvatada kristallisatsiooninõus või suuremas mahutis. Mahuti põhi kaetakse ligikaudu 5–10 mm paksuse peene kvartsi- liiva kihiga. Diatomiit (näiteks Merck, Art 8117) on samuti tõendatult sobiv substraat (piisab õhemast kihist, isegi mõnest millimeetrist). Seejärel lisatakse sobivat vett mitme cm paksuse kihina. Vett tuleks vajaduse korral lisada aurumiskadude asendamiseks ja kuivamise vältimiseks. Vee võib vajaduse korral välja vahetada. Tuleks tagada kerge aereerimine. Vastsete kasvatamise nõusid tuleks hoida vastavas puuris, millega takistatakse väljaarenenud täiskasvanud isendite väljapääsu. Puur peaks olema piisavalt suur, et võimaldada väljaarenenud valmikute parvedesse kogunemist, vastasel juhul ei pruugi toimuda paljunemist (miinimumsuurus on ligikaudu 30 × 30 × 30 cm).
2. Puure tuleks hoida toatemperatuuril või püsiva keskkonnaga ruumis temperatuuril 20 ± 2 °C 16-tunnise valgustusperioodiga (intensiivsus ligikaudu 1 000 luksi) ja kaheksa tunni pimedusega. On teada, et vähem kui 60 %-line suhteline õhuniiskus võib paljunemist takistada.

Lahjendusvesi

3. Võib kasutada mis tahes looduslikku või sünteetilist vett. Enamasti kasutatakse kaevuvett, dekllooritud kraanivett ja tehisliske kasvukeskkondi (näiteks Elendti kasvukeskkond M4 või M7, vt allpool). Vett tuleb enne kasutamist aereerida. Vajaduse korral võib kultuuri kasvuvett uuendada, eemaldades kasutatud vee kultuuri kasvunõudest ettevaatlikult valamise teel või sifooniga, kahjustamata vastsete kestasid.

Vastsete söötmine

4. *Chironomus*'e vastseid tuleks sööta helbelise kalasöödaga (TetraMin®, TetraPhyll® või muu samalaadne kaubanduslik kalasööda tootemark) koguses ligikaudu 250 mg nõu kohta päevas. Sööta võib anda kuiva jahvatatud pulbrina või suspensioonina vees: 1,0 g helbelist kalasööta lisatakse 20 ml lahjendusveele ja see segatakse homogeense segu saamiseni. Seda preparaati võib sööta koguses 5 ml nõu kohta päevas (preparaati tuleks enne kasutamist loksutada). Vanemad vastsed võivad vajada rohkem sööta.
5. Söötmist kohandatakse vee kvaliteediga. Kui kultuuri kasvukeskkond muutub häguseks, tuleks sööda hulka vähendada. Sööda lisamist tuleb hoolikalt jälgida. Liiga vähe sööta põhjustab vastsete rände veesamba suunas ning liiga palju sööta hoogustab mikroobide tegevust ja vähendab vee hapnikusisaldust. Mõlemad tingimused võivad vähendada kasvu kiirust.
6. Uute kultuuri kasvunõude valmisseedmisel võib lisada ka mõne rohevetika (näiteks *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) rakke.

Väljaarenenud valmikute söötmine

7. Mõned teadlased on soovitanud väljaarenenud valmikute söötmiseks kasutada küllastunud sahharoosilahuses niisutatud puuvillast lappi.

▼ M4**Väljaarenemine**

8. Ligikaudu 13–15 päeva möödumisel hakkavad temperatuuril 20 ± 2 °C vastsete kasvatamise nõudest väljuma valmikud. Isased on tänu sulgjatele tundlatele kergesti äratuntavad.

Munamassid

9. Kui valmikud on paljundamispuuris, tuleks kõiki vastsete kasvatamise nõusid kontrollida kolm korda nädalas sinna želatiinjate munamasside lisanudumise suhtes. Kui leitakse munamass, tuleks see hoolikalt kõrvaldada. See tuleks üle kanda väiksele tassile, mis sisaldab paljundusvee proovi. Munamasse kasutatakse uue kasvunõu kasutusele võtmiseks (näiteks 2–4 muna-massi nõu kohta) või mürgisuse katsetes.

10. Esimese kasvujärgu vastsed peaksid kooruma 2–3 päeva pärast.

Uute kasvunõude ülesseadmine

11. Kui kultuurid on loodud, peaks iga nädal (või katsenõuetest olenevalt väiksema sagedusega) olema võimalik vastsete uute kasvunõude ülesseadmine, kõrvaldades vanemad nõud pärast täiskasvanud sääskede väljaarenemist. Seda süsteemi kasutades saadakse minimaalse vaevaga regulaarne valmikute varu.

Katselahuste M4 ja M7 valmistamine

12. Elendt (1990) on kirjeldanud kasvukeskkonda M4. Kasvukeskkond M7 valmistatakse samal viisil kui kasvukeskkond M4, v.a tabelis 1 nimetatud ainete puhul, mille kontsentratsioon kasvukeskkonnas M7 on kasvukeskkonnaga M4 võrreldes neli korda väiksem. Kasvukeskkonda M7 käsitlev artikkel on kirjutamisel (Elendt, isiklik teade). Katselahust ei tohiks koostada Elendti ja Biasi (1990) järgi, kuna põhilahuste valmistamiseks ei ole antud $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , K_2HPO_4 ja K_2HPO_4 kontsentratsioon sobiv.

Kasvukeskkonna M7 valmistamine

13. Iga põhilahus (I) valmistatakse eraldi ja kombineeritud põhilahus (II) valmistatakse kõnealustest põhilahustest (I) (vt tabel 1). Kasvukeskkonna M7 valmistamiseks võetakse 50 ml kombineeritud põhilahust (II), lisatakse iga makrotoitainete põhilahuse kogused, mis on esitatud tabelis 2 ja täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini. Vitamiinide põhilahuse valmistamiseks lisatakse deioniseeritud veele kolme vitamiini, nagu on näidatud tabelis 3, ja lõplikule M7 kasvukeskkonnale lisatakse vahetult enne selle kasutamist 0,1 ml kombineeritud vitamiinide põhilahust. (Vitamiinide põhilahust säilitatakse külmutatult väikeste alikvootidena). Kasvukeskkonda aereeritakse ja see stabiliseeritakse.

KIRJANDUS

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streløkke and H.Köpp. Berlin 1995.

▼M4

Tabel 1

Kasvukeskkondade M4 ja M7 mikroelementide põhilahused

Põhilahus (I)	Kogus (mg), mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini	Kombineeritud põhilahuse (II) valmistamiseks: segage põhilahuste (I) järgmised kogused (ml) ja täiendage need 1 liitrini deioniseeritud veega		Lõppkontsentratsioonid katselahustes (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H ₃ BO ₃ (1)	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
MnCl ₂ · 4 H ₂ O (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 · 6 H ₂ O (1)	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr (1)	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O (1)	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl ₂ · 2 H ₂ O (1)	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O (1) (2)	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7 H ₂ O (1) (2)	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

(1) Need ained on M4 ja M7 puhul erinevad, nagu on eespool viidatud.

(2) Need lahused valmistatakse eraldi, valatakse seejärel kokku ja autoklaavitakse viivitamata.

Tabel 2

Kasvukeskkondade M4 ja M7 makrotoitainete põhilahused

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini (mg)	Kasvukeskkondade M4 ja M7 valmistamiseks lisatav makrotoitainete põhilahuste kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

▼ **M4**

Tabel 3

Kasvukeskkondade M4 ja M7 vitamiinide põhilahus. Vitamiinide ühe põhilahuse valmistamiseks valatakse kokku kõik kolm vitamiinilahus

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitriini (mg)	Kasvukeskkondade M4 ja M7 valmistamiseks lisatav vitamiinide põhilahuse kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinvesinikkloriid	750	0,1	0,075
Tsüanokobalamiin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiin	7,5	0,1	0,00075

KIRJANDUS

Elendt, B.P. (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt, B.P. & W.-R. Bias (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* 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**

3. liide

SPETSIAALSELT KOOSTATUD SETTE VALMISTAMINE

Sette koostis

Spetsiaalselt koostatud sette koostis peaks olema järgmine:

Koostisosa	Kirjeldus	Sette kuivmassi protsent
Turvas	Turbasamblaturvas, mille pH on võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0, nähtavad taimeosad puuduvad, peeneks jahvatatud (osakese suurus ≤ 1 mm) ja õhu käes kuivatatud	4–5
Kvartslüiv	Tera suurus: > 50 % osakes-test peaksid olema vahemikus 50–200 µm	75–76
Kaoliinsavi	Kaoliniidisaldus ≥ 30 %	20
Orgaaniline süsinik	Reguleeritakse turba ja liiva lisamisega	2 (±0,5)
Kaltsiumkarbonaat	CaCO ₃ , pulbriks jahvatatud, keemiliselt puhas	0,05–0,1
Vesi	Juhtivus ≤ 10 µS/cm	30–50

Valmistamine

Turvas kuivatatakse õhu käes ja jahvatatakse peeneks pulbriks. Valmistatakse vajaliku turbapulbrikoguse suspensioon deioniseeritud vees, kasutades tõhusat homogenisaatorit. Selle suspensiooni pH reguleeritakse CaCO₃ abil vahemikku 5,5 ± 0,5. Suspensiooni konditsioneeritakse vähemalt kaks päeva temperatuuril 20 ± 2 °C kerge segamisega, et stabiliseerida pH ja luua stabiilne mikroobikomponent; pH mõõdetakse uuesti ja see peaks olema 6,0 ± 0,5. Seejärel segatakse turba suspensioon muude koostisosadega (liiv ja kaoliinsavi) ning deioniseeritud veega, et saada homogeenne sete, mille veesisaldus on vahemikus 30–50 % sette kuivmassist. Lõpliku segu pH mõõdetakse uuesti ja see reguleeritakse vajaduse korral CaCO₃ abil vahemikku 6,5–7,5. Kuivmassi ja orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks võetakse sette proovid. Enne, kui spetsiaalselt koostatud setet kasutatakse surusääsklastele mürgisuse katses, on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus.

Säilitamine

Tehisliku sette valmistamiseks kasutatavaid kuivi koostisosi võib säilitada kuivas ja jahedas kohas toatemperatuuril. Spetsiaalselt koostatud (märga) setet ei tohiks enne selle katses kasutamist säilitada. Seda tuleks kasutada viivitamata pärast seitsmepäevast kohandamisperioodi, millega selle valmistamine lõpetatakse.

KIRJANDUS

Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (*Oligochaeta*) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10–20.

▼ **M4**

4. liide

Kasutuskõlbliku lahjendusvee keemilised omadused

Aine	Kontsentratsioonid
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku kogusisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Karedus CaCO ₃ -na	< 400 mg/l (*)
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülide üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

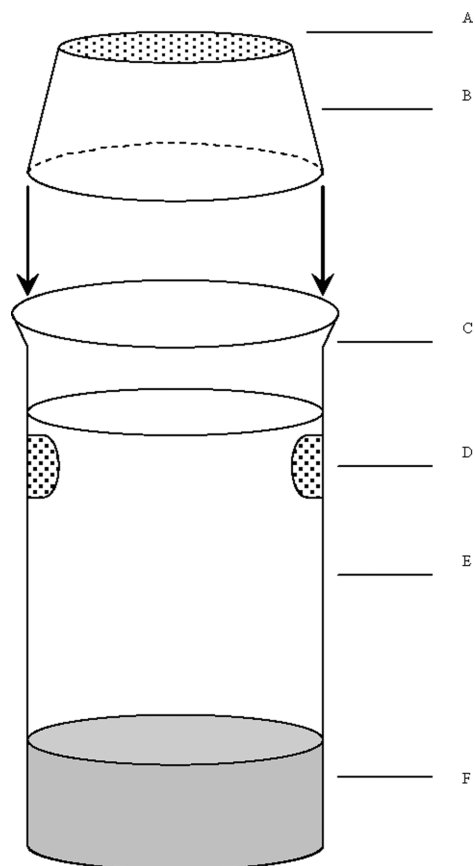
(*) Kui kahtlustatakse karedust tekitavate ionide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks nimetatud olukorras kasutada Elendti kasvukeskkonda M4).

▼ **M4**

5. liide

Suunised surusääsklaste vastsete valmikuteks väljaarenemise seireks

Katsenõudele paigaldatakse väljaarenenud valmikute püüdurid. Neid püüdreid vajatakse alates 20. päevast kuni katse lõpuni. Kasutatava püüduri näidis on esitatud allpool.



A – nailonvõrk

B – tagurpidi pööratud plastiktopsid

C – tilata kokkupuutenõu

D – sõelaga kaetud veevahetusavad

E – vesi

F – sete

▼ **M4****C.28. SETTE-VEE MÜRGISUSKATSE SURUSÄÄSKLASTEL
RIKASTATUD VEE KASUTAMISEGA****SISSEJUHATUS**

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 219 (2004). Käesolev katsemeetod on kavandatud selleks, et hinnata pikaajalise kemikaalidega kokkupuute mõju settes elavatele magevee kahetiivaliste (*Chironomus* sp.) vastsetele. See põhineb peamiselt BBA suunisel, milles kasutatakse sette-vee katsesüsteemi tehniliku mullaga ning veesamba kokkupuute stsenaariumiga (1). Selles võetakse samuti arvesse *Chironomus riparius*'e ja *Chironomus tentans*'i kohta olemas olevaid mürgisuse määramise katse-eeskirju, mis on koostatud Euroopas ja Põhja-Ameerikas (2, 3, 4, 5, 6, 7, 8) ning mille puhul on tehtud laboritevahelised võrdluskatsed (1, 6, 9). Võib kasutada ka muid hästi dokumenteeritud surusääsklaste liike, näiteks *Chironomus yoshimatsui*'d (10, 11).
2. Käesolevas katsemeetodis kasutatud kokkupuutestsenaarium on vee rikastamine. Sobiva kokkupuutestsenaariumi valimine oleneb katse kavandatud eesmärgist. Vee kokkupuutestsenaarium, mis hõlmab veesamba rikastamist, on kavandatud simuleerima pihustatud pestitsiidide hõljumist ja hõlmab esialgseid maksimaalseid kontsentratsioone pooriveses. See on kasulik ka muud tüüpi kokkupuudete puhul (sh keemilised lekked), v.a katseperioodist pikemate kogunemisprotsesside puhul.
3. Ained, mille kohta on vaja teha katsed settes elavate organismidega, jäävad tavaliselt sellesse keskkonda pikaks ajaks püsima. Settes elavad organismid võivad kemikaaliga mitmel viisil kokku puutuda. Iga kokkupuutete suhteline tähtsus ja aeg, mis on iga kokkupuutete puhul vajalik üldisse mürgisusse panuse andmiseks, sõltub asjaomase kemikaali füüsikalise-keemilistest omadustest. Tugevasti adsorbeeruvate ainete (näiteks $\log K_{ow} > 5$) või settega kovalentseid sidemeid moodustavate ainete puhul võib tähtis kokkupuutete olla manustamine saastunud toiduga. Väga lipofiilsete ainete mürgisuse alahindamise vältimiseks võib kaaluda settele sööda lisamist enne uuritava aine kasutamist. Kõigi võimalike kokkupuutete arvessevõtmiseks on käesolevas katsemeetodis keskendunud pikaajalisele kokkupuutele. *C. riparius*'e ja *C. yoshimatsui* puhul kestab katse 20–28 päeva ning *C. tentans*'i puhul 28–65 päeva. Kui konkreetsel põhjusel vajatakse andmeid lühema aja kohta, näiteks ebastabiilse kemikaali mõju uurimiseks, võib kümnapäevase ajavahemiku järel võtta täiendavad paralleelproovid.
4. Mõõdetavad näitajad on vastsetest arenenud valmikute koguarv ja nende arenemiseks vajalik aeg. Vastsete elulemust ja kasvu soovitatakse mõõta alles pärast kümnapäevase ajavahemiku möödumist; kui lisaks vajatakse andmeid lühema aja kohta, kasutatakse vajaduse korral täiendavaid paralleelkatseid.
5. Soovitatakse kasutada spetsiaalselt koostatud setet. Spetsiaalselt koostatud settel on loodusliku sette ees mitmeid eeliseid:
 - väheneb katsete hajuvus, kuna nii saadakse reprodutseeritav standardiseeritud maatriksi ja kõrvaldatakse vajadus saastumata ja puhaste settealike leidmiseks;
 - katseid võib alustada ükskõik millal, ei tule arvestada katse setete hooajalist muutlikkust ja setet ei ole vaja eeltöödelda kohaliku fauna kõrvaldamiseks; spetsiaalselt koostatud sette kasutamine vähendab samuti korrapäraseks katsetamiseks kohapeal piisavas koguses sette kogumisega seotud kulusid;

▼M4

— spetsiaalselt koostatud sette kasutamine võimaldab mürgisust võrrelda ja selle põhjal aineid järjestada: mürgisuse andmed looduslike ja tehislise setetega tehtud katsetest olid mitme kemikaali puhul võrreldavad (2).

6. Kasutatud mõisted on esitatud 1. liites.

KATSE PÕHIMÕTE

7. Kõigepealt puutuvad surusääsklaste esimese kasvujärgu vastsed kokku sette-vee süsteemis teatavas kontsentratsioonivahemikus oleva uuritava ainega. Katse alguses pannakse esimese kasvujärgu vastsed katsenõudesse, mis sisaldavad sette-vee süsteemi, ja seejärel lisatakse uuritav aine vette (vesi „rikastatakse“ uuritava ainega). Katse lõpus mõõdetakse surusääsklaste väljaarenemise määra ja arengu kiirust. Vastsete elulemust ja massi võib vajaduse korral mõõta ka kümne päeva möödumisel (kasutades vajaduse korral täiendavaid paralleelkatseid). Neid andmeid analüüsitakse kas regressioonimudeli abil, et hinnata kontsentratsioon, mis põhjustab valmikute väljaarenemise või vastsete elulemuse või kasvu x % vähenemise (näiteks EC_{15} , EC_{50} jne), või kasutades täheldatava toimeta kontsentratsiooni / vähima täheldatava toimega kontsentratsiooni määramiseks statistilise hüpoteesi testimise meetodit. Viimati nimetatud juhul tuleb täheldatud mõju väärtusi võrrelda statistiliste testide abil kontrollkatses määratud väärtustega.

ANDMED UURITAVA AINE KOHTA

8. Teada peaks olema uuritava aine lahustuvus vees, aururõhk, mõõdetud või arvutatud jaotumine settesse ning stabiilsus vees ja settes. Kättesaadav peaks olema usaldusväärne analüüsimeetod uuritava aine kvantitatiivseks määramiseks katvas veekihi, poorivees ja settes; meetodi täpsus ja määramispiir peaksid olema teada. Kasulik on teada uuritava aine struktuurivalemit ja puhtust. Samuti on kasulik teada uuritava aine keemilist käitumist (näiteks hajumine, abiootiline ja biootiline lagunemine jne). Täiendavad juhised selliste ainete mõju uurimiseks, mille füüsikalised-keemilised omadused raskendavad selle katse tegemist, on esitatud (12).

VÕRDLUSKEMIKAALID

9. Võrdluskemikaale võib katsetada regulaarselt, et tagada katse-eeskirjade ja katsetingimuste täitmise usaldusväärsus. Laboritevahelistes võrdlustes ja valideerimisuuringutes edukalt kasutatud võrdlustoksikandid on näiteks: lindaan, trifluraliin, pentaklorofenool, kaadmiumkloriid ja kaaliumkloriid (1, 2, 5, 6, 13).

KATSE KEHTIVUS

10. Katse kehtivuse tõendamisel arvestatakse järgmist:

— kontrollnõus peab katse lõpuks välja arenema vähemalt 70 % putukaid (1, 6);

— *C. riparius* 'e ja *C. yoshimatsui* valmikute väljaarenemine kontrollnõudes peaks toimuma 12–23 päeva jooksul pärast nende viimist nõudesse; *C. tentans* 'i puhul on vajalik ajavahemik 20–65 päeva;

— katse lõpus tuleks igas nõus mõõta pH ja lahustunud hapniku kontsentratsioon. Hapnikukontsentratsioon peaks olema vähemalt 60 % õhuga küllastamisel saadud väärtusest kasutataval temperatuuril ja katva veekihi pH peaks kõigis katsenõudes olema vahemikus 6–9;

▼ **M4**

— vee temperatuur ei tohiks erineda rohkem kui $\pm 1,0$ °C võrra. Vee temperatuuri on võimalik kontrollida isotermilise ruumi abil ja sel juhul peaks ruumi temperatuur olema sobivate ajavahemike järel kinnitatud.

MEETODI KIRJELDUS**Katsenõud**

11. Uuring tehakse 600 ml klaasist katsenõudega, mille läbimõõt on 8 cm. Muud nõud on sobivad, kuid need peaksid tagama katva veekihi ja sette vajaliku paksuse. Sette pind peaks olema piisav, et tagada vastse kohta 2–3 cm². Settekihi paksuse ja katva veekihi paksuse suhe peaks olema 1 : 4. Katsenõud ja muud seadmed, mis katsesüsteemiga kokku puutuvad, peaksid olema valmistatud täies ulatuses klaasist või muust keemiliselt inertsest materjalist (näiteks teflonist).

Liigi valimine

12. Katses kasutatav liik on eelistatavalt *Chironomus riparius*. *Chironomus tentans* on samuti sobiv, aga selle käsitlemine on keerukam ja see nõuab pikemat katseperioodi. *Chironomus yohimatsui* kasutamine on samuti võimalik. 2. liites on esitatud andmed *Chironomus riparius*'e kultuuri kasvatamise meetodite kohta. Ka muude liikide, nagu *Chironomus tentans*'i (4) ja *Chironomus yohimatsui* (11) kultuuri kasvatamise tingimused on avaldatud. Enne katset tuleb kinnitada liigi määramist, aga seda ei nõuta enne iga katset, kui organismid pärinevad asutusesisest kultuurist.

Sete

13. Eelistatavalt tuleks kasutada spetsiaalselt koostatud setet (mida nimetatakse ka taastatud, tehislükku või sünteetiliseks setteks). Loodusliku sette kasutamise korral tuleks seda iseloomustada (vähemalt pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, samuti on soovitatav määrata muud parameetrid, nagu süsiniku-lämmastiku suhe ja granulomeetria) ning selles ei tohiks olla mingeid saasteaineid ega muid organisme, kes võiksid surusääsklastega konkureerida või neid süüa. Enne loodusliku sette kasutamist surusääsklastel avalduva mürgisuse katses on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus. Käesolevas katses soovitatakse kasutada järgmist spetsiaalselt koostatud setet, mis põhineb katsemeetodis C.8 (14) kasutataval tehismullal (1, 15, 16):

- a) 4–5 % (kuivmass) turvast: pH väärtus võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0; tähtis on kasutada peeneks jahvatatud (osakese suurus \leq 1 mm) pulbrilist turvast, mida on kuivatatud ainult õhu käes;
- b) 20 % (kuivmass) kaoliinsavi (kaoliniidisisaldus eelistatavalt üle 30 %);
- c) 75–76 % (kuivmass) kvartsiiva (see peaks peamiselt koosnema peenest liivast ja rohkem kui 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 μ m);
- d) lõplikus segus niiskusesisalduse 30–50 % saamiseks lisatakse deioniseeritud vett;
- e) sette lõpliku segu reguleerimiseks pH vahemikku $7,0 \pm 0,5$ lisatakse keemiliselt puhast kaltsiumkarbonaati (CaCO₃);
- f) Lõpliku segu orgaanilise süsiniku sisaldus peaks olema 2 % ($\pm 0,5$ %) ja see tuleks õigeks seada sobivas koguses turba ja liiva kasutamisega kooskõlas alapunktidega a ja c.

▼ M4

14. Turba, kaoliinsavi ja liiva päritolu peaks olema teada. Sette koostisosi tuleks kontrollida, et tõendada keemilise saaste puudumine (näiteks raskmetallid, kloororgaanilised ühendid, fosfororgaanilised ühendid jne). Spetsiaalselt koostatud sette valmistamise näidis on esitatud 3. liites. Kuivade koostisosade segamine on samuti lubatav, kui tõendatakse, et pärast katva veekihi lisamist ei toimu sette koostisosade eraldumist (näiteks turbaosakeste hõljumist) ja et turvas või sete on piisavalt konditsioneerunud.

Vesi

15. Katseveeks sobib vesi, mis vastab 2. ja 4. liites esitatud lahjendamiseks kasutatava vee nõutavatele keemilistele omadustele. Kasvuveena ja katseveena lubatakse kasutada iga sobivat vett, looduslikku vett (pinna- või põhjavesi), taastatud vett (vt 2. liide) või dekloritud kraanivett, kui surusääsklased jäävad selles kasvatamise ja katsetamise ajal ellu ega ilmuta stressi tunnuseid. Katse alguses peaks katsevee pH olema vahemikus 6–9 ja vee summaarne karedus ei tohiks olla suurem kui 400 mg/l CaCO₃-na. Kui oletatakse karedust tekitavate ioonide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada siiski väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks sel juhul kasutada Elendti kasvukeskkonda M4). Kogu uuringu vältel tuleks kasutada sama tüüpi vett. 4. liites loetletud vee kvaliteedi omadusi tuleks mõõta vähemalt kaks korda aastas või siis, kui kahtlustatakse, et kõnealused omadused võivad olla oluliselt muutunud.

Põhilahused – rikastatud vesi

16. Katsekonsentratsioonid arvutatakse veesambas olevate kontsentratsioonide alusel, s.o setet katva veekihi alusel. Valitud kontsentratsiooniga uuritavad lahused valmistatakse tavaliselt põhilahuse lahjendamise teel. Põhilahuse valmistamiseks on soovitatav lahustada uuritav aine katsekeskkonnas. Mõnel juhul võib sobiva kontsentratsiooniga põhilahuse valmistamiseks olla vajalik lahusti või dispergendi kasutamine. Sobivad lahustid on atsetoon, etanool, metanool, etüleenglükoolmonometüüleeter, etüleenglükooldimetüüleeter, dimetüülformamiid ja trietüleenglükool. Sobivad dispergendid on Cremophor RH40, Tween 80, metüülselluloos (0,01 %) ja HCO-40. Solubiliseeriva aine kontsentratsioon lõplikus katse kasvukeskkonnas peaks olema minimaalne (s.o ≤ 0,1 ml/l) ja see peaks olema sama kõigi töötlemiste puhul. Solubiliseeriva aine kasutamisel ei tohi sellel olla märkimisväärset mõju surusääsklaste vastsete elulemusele ega märgatavat negatiivset mõju surusääsklaste vastsetele, mida saab täheldada üksnes lahustiga tehtava kontrollkatse abil. Siiski tuleks teha kõik, et vältida selliste kemikaalide kasutamist.

KATSE KAVANDAMINE

17. Katse kavandamine hõlmab katse kontsentratsioonide arvu ja vahemike valimist, iga kontsentratsioonitaseme jaoks nõude arvu ning igas nõus olevate vastsete arvu valimist. Kirjeldatud on, kuidas hinnata EC-punktide väärtusi ja täheldatava toimeta kontsentratsiooni ning teha piirsalduskatset. Regressioonanalüüs on eelistatav statistilise hüpoteesi kontrollimise lähenemisviisile.

Regressioonanalüüsi kavandamine

18. Katses kasutatavad kontsentratsioonid peaksid hõlmama toimet avaldavat kontsentratsiooni (nt EC₁₅, EC₅₀) ja uuritava aine puhul huvi pakkuvat kontsentratsioonivahemikku. Tavaliselt paraneb toimet avaldavate kontsentratsioonide (EC_x) hinnangute täpsus ja eelkõige kehtivus, kui toimet avaldav kontsentratsioon on uuritud kontsentratsioonide vahemikus. Tuleks

▼ **M4**

vältida suurt ekstrapoleerimist allapoole väikseimat positiivset kontsentratsiooni või ülespoole suurimat kontsentratsiooni. Eelnev annusevahemiku leidmise katse aitab valida kasutatavat kontsentratsioonivahemikku (vt punkt 27).

19. Kui tuleb hinnata EC_{50} , tuleks katse teha vähemalt viie kontsentratsiooniga ja iga kontsentratsiooni kohta tuleks kasutada kolme paralleelkatset. Igal juhul on mudeli korraliku hindamise jaoks soovitatav kasutada piisavaid uuritavaid kontsentratsioone. Kontsentratsioonidevaheline kordaja ei tohiks olla suurem kui 2 (erandi võib teha juhul, kui doosi mõju graafiku tõus on madal). Iga doosi paralleelkatsete arvu võib vähendada, kui suurendatakse eri mõjuga uuritavate kontsentratsioonide arvu. Paralleelkatsete arvu suurendamine või uuritavate kontsentratsioonide vahemiku vähendamine enamasti vähendab usaldusvahemikku. Kui on vaja hinnata vastsete elulemust ja kasvu kümne päeva järel, on vaja võtta täiendavaid paralleelproove.

Täheldatava toimeta kontsentratsiooni / vähima täheldatava toimega kontsentratsiooni hindamise kavandamine

20. Kui hinnatakse täheldatava toimeta kontsentratsiooni või vähimat täheldatava toimega kontsentratsiooni, tuleks kasutada viit uuritavat kontsentratsiooni vähemalt nelja paralleelkatsega ja kõnealuseid kontsentratsioone eraldav kordaja ei tohiks olla suurem kui 2. Paralleelkatsete arv peaks olema piisav, et tagada piisav statistiline võimsus, et tuvastada katse- ja kontrollnõu tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ($p = 0,05$). Arengu kiiruse puhul on üldiselt asjakohane variatsioonanalüüs (ANOVA), näiteks Dunnetti test ja Williamsi test (17, 18, 19, 20). Väljaarenemise suhte puhul võib kasutada Cochran-Armitage'i testi, Fisheri täpset testi (Bonferroni parandusega) või Manteli-Haenszeli testi.

Piirsalduskatse

21. Kui esialgsetes annusevahemiku leidmise katsetes tulemusi ei saadud, võib teha piirsalduskatse (üks katsekonsentratsioon ja kontroll). Piirsalduskatse eesmärk on näidata, et uuritava aine mürgine kontsentratsioon on katsetatud piirkontsentratsioonist suurem. Käesolevas katsemeetodis soovituslikku piirkontsentratsiooni ei esitata; see jäetakse reguleerivate asutuste otsustada. Enamasti tuleb nii töötlus- kui ka kontrollseadmetega teha vähemalt kuus paralleelkatset. Tuleks tõendada piisava statistilise võimsuse olemasolu, et tuvastada katse- ja kontrollnõu tulemuste 20 % erinevus 5 % statistilise olulisusega ($p = 0,05$). Mõõdetavate suuruste (arengu kiirus ja kaal) puhul, kui andmed vastavad käesoleva katse nõuetele (normaalsus, ühtlane hajumine), on asjakohane statistiline meetod t-kriteerium. Kui need nõuded ei ole täidetud, võib kasutada mittevõrdse hajumise t-kriteeriumi või mitteparameetrilist testi, näiteks Wilcoxon-Manni-Whitney testi. Valmikute väljaarenemise suhte puhul on asjakohane kasutada Fisheri täpset testi.

KATSE KÄIK

Kokku puutetingimused

Rikastatud vee-sette süsteemi valmistamine

22. Katsenõudesse lisatakse vähemalt 1,5 cm kihi tekitamiseks vajalik kogus spetsiaalselt koostatud setet (vt punktid 13-14 ja 3. liide). Vett lisatakse 6 cm paksuse kihini (vt punkt 15). Settekihi ja veekihi paksuse suhe ei tohiks ületada 1 : 4 ja settekihi paksus ei tohiks olla suurem kui 3 cm. Sette-vee süsteem tuleks jätta enne katseorganismide lisamist seitsmeks päevaks kerge aeratsiooni tingimustesse (vt punkt 14 ja 3. liide). Sette osade eraldumise ja veesambas katsevee lisamisel peene materjali uue suspensiooni tekkimise vältimiseks võib sette katta vee valamise ajal plastikkettaga, mis pärast vee valamist kohe eemaldatakse. Võib kasutada ka muid võtteid.

▼ **M4**

23. Katsenõud peaksid olema kaetud (näiteks klaasplaadiga). Vajaduse korral lisatakse vee aurumise kompenseerimiseks ja uuringu algse veetaseme saavutamiseks vett. Soolade kogunemise vältimiseks tuleks lisada destilleeritud või deioniseeritud vett.

Katseorganismide lisamine

24. Neli kuni viis päeva enne katseorganismide lisamist katsenõudesse tuleks võtta kultuuridest munamassid ja asetada need väikestesse nõudesse kultuuri kasvukeskkonnas. Võib kasutada varukultuuri vana kasvukeskkonda või värskest valmistatud kasvukeskkonda. Viimati nimetatul kasutamisel tuleks lisada kultuuri kasvukeskkonnale väikses koguses sööta, näiteks rohevetikaid ja/või paar tilka peeneks jahvatatud helbelise kalasööda suspensiooni filtraadist (vt 2. liide). Tuleks kasutada ainult värskest munetud munamasse. Tavaliselt hakkavad vastsed kooruma paari päeva möödumisel munade munemisest (2–3 päeva *Chironomus riparius*'e puhul temperatuuril 20 °C ning 1–4 päeva *Chironomus tentans*'i puhul temperatuuril 23 °C ja *Chironomus yoshimatoi* puhul temperatuuril 25 °C) ja vastsed kasvavad neljas kasvujärgus, millest iga kasvujärk kestab 4–8 päeva. Katses tuleks kasutada esimese kasvujärgu vastseid (2–3 või 1–4 päeva pärast koorumist). Sääskede kasvujärke on võimalik kontrollida peakapsli laiuse mõõtmisega (6).

25. Tõmbi pipeti abil jaotatakse 20 esimese kasvujärgu vastset juhuslikult igasse katsenõusse, mis sisaldavad rikastatud setet ja vett. Vee aereerimine tuleb vastsete katsenõudesse lisamise ajal peatada ja seda ei jätkata 24 tunni vältel pärast vastsete lisamist (vt punktid 24 ja 32). Kasutatava katsekava kohaselt (vt punktid 19 ja 20) on kasutatud vastsete arv kontsentratsiooni kohta toimet avaldava kontsentratsiooni (EC-punkti) hindamise korral vähemalt 60 ja täheldatava toimeteta kontsentratsiooni määramise korral 80.

26. 24 tundi pärast vastsete lisamist rikastatakse uuritavat ainet katva veekihi sambasse ja alustatakse uuesti kergelt aereerimist. Uuritava aine lahuseid lisatakse pipeti abil väikses koguses veepinna alla. Seejärel tuleks kattev veekiht ilma setet mõjutamata ettevaatlikult segada.

Uuritavad kontsentratsioonid

27. Annusevahemiku leidmise katse võib aidata kindlaks teha lõpliku katse kontsentratsioonivahemikke. Selleks kasutatakse uuritava aine laiade vahedega kontsentratsioonide seeriat. Lõplikus katses kasutatavaga sama pindtiheduse tagamiseks iga surusääsklase kohta puutuvad surusääsklased kokku uuritava aine iga kontsentratsiooniga sellise ajavahemiku vältel, mis võimaldab hinnata asjakohaseid katsekonsentratsioone; paralleelproovid ei ole vajalikud.

28. Lõpliku katse kontsentratsioonid määratakse kindlaks annusevahemiku leidmise katse tulemuse alusel. Tuleks kasutada vähemalt viit kontsentratsiooni ja need tuleks valida nii, nagu on kirjeldatud punktides 18–20.

Kontrollkatsed

29. Katse peaks hõlmama vajalikku arvu paralleelseid settega kontrollkatsenõusid, milles ei ole uuritavat ainet (vt punktid 19-20). Kui uuritava aine lisamiseks on kasutatud lahustit (vt punkt 16), tuleks teha settele lahusti lisamise kontrollkatse.

▼ **M4***Katsesüsteem*

30. Kasutatakse staatilisi süsteeme. Erandjuhul võib kasutada poolstaatilisi või läbivooluga süsteeme koos katva veekihi vahelduva või pideva uuendamisega, näiteks kui vee kvaliteet ei ole katseorganismile enam sobiv või mõjutab kemikaali tasakaaluolekut (näiteks lahustunud hapniku tase langeb liiga madalale, väljutatud saaduste kontsentratsioon muutub liiga suureks või settest leostuvad mineraalained, mis mõjutavad pH-d ja/või vee karedust). Tavaliselt on siiski piisavad ja eelistatavad muud katva veekihi kvaliteedi parandamise meetodid, näiteks aereerimine.

Sööt

31. Vastseid tuleb sööta eelistatavalt iga päev või vähemalt kolm korda nädalas. Kalasööt (suspensioon vees või peeneks jahvatatud sööt, näiteks TetraMin või TetraPhyll; vt andmed, 2. liide) koguses 0,25–0,5 mg (0,35–0,5 mg *C. yoshimatu* puhul) vastse kohta päevas näib olevat esimese kümne päeva jooksul noorte vastsete jaoks piisav. Vanemad vastsed võivad vajada mõnevõrra rohkem sööta: 0,5–1 mg vastse kohta päevas peaks olema piisav ülejäänud katse vältel. Söödakogust tuleks vähendada kõigi kokkupuute- ja kontrollkatsete puhul, kui täheldatakse seente kasvu või kui kontrollkatses täheldatakse suremust. Kui seente kasvu ei ole võimalik peatada, tuleb katset korrata. Kui katseid tehakse tugevalt adsorbeeruva ainega (näiteks $\log K_{ow} > 5$) või settega kovalentseid sidemeid tekitava ainega, võib enne stabiliseerumise ajavahemikku lisada spetsiaalselt koostatud settele sellise söödakoguse, mis on vajalik organismide elulemise ja loodusliku kasvu tagamiseks. Selleks tuleb kasutada kalasööda asemel taimset materjali, näiteks võib kasutada 0,5 % (kuivmass) kõrvenõgese (*Urtica dioica*), mooruspuu (*Morus alba*), valge ristiku (*Trifolium repens*), spinati (*Spinacia oleracea*) peeneks jahvatatud lehti või muud taimset materjali (*Cerophyl* või alfatselluloos).

Inkubeerimistingimused

32. Eelistatavalt 24 tundi pärast vastsete lisamist hakatakse katsenõudes katvat veekihti kergelt aereerima, mida jätkatakse kogu katse vältel (tuleb olla hoolikas, et lahustunud hapniku kontsentratsioon ei langeks alla 60 % hapniku küllastuskontsentratsioonist). Aereerimiseks kasutatakse klaasist Pasteuri pipetti, mis on kinnitatud settekihi kohale 2–3 cm kõrgusele (üks või mõni mull sekundis). Lenduva kemikaali katsetamisel võib kaaluda sette-vee süsteemi aereerimisest loobumist.
33. Katse tehakse püsival temperatuuril 20 °C (± 2 °C). *C. tentans* i ja *C. yoshimatu* i puhul on soovitatavad temperatuurid vastavalt 23 °C ja 25 °C (± 2 °C). Kasutatakse 16-tunnist valgustusperioodi ja valguse intensiivsus peaks olema 500 kuni 1 000 luksit.

Kokkupuute kestus

34. Kokkupuute algab vastsete lisamisega rikastatud ja kontrollnõudesse. Maksimalne kokkupuute kestus on 28 päeva *C. riparius* e ja *C. yoshimatu* i puhul ning 65 päeva *C. tentans* i puhul. Kui sääsed arenevad välja varem, võib katse lõpetada vähemalt viie päeva möödumisel pärast viimase valmiku väljaarenemist kontrollnõus.

VAATLUSED

Väljaarenemine

35. Tehakse kindlaks arengu aeg ja täielikult väljaarenenud isas- ja emassäädede koguarv. Isased on tänu sulgjatele tundlatele kergesti äratuntavad.

▼ **M4**

36. Katsenõusid tuleks vaadelda vähemalt kolm korda nädalas, et hinnata visuaalselt iga ebatavalist käitumist (näiteks settest väljumine, ebatavaline ujumine) kontrollnõuga võrreldes. Oodataval valmikute ilmumise ajal loendatakse sääski iga päev. Registreeritakse täielikult välja arenenud sääskede sugu ja arv. Pärast tuvastamist kõrvaldatakse sääsed nõudest. Enne katse lõpetamist munetud munamassid tuleks registreerida ja seejärel eemaldada, et vältida settesse uute vastsete teket. Samuti registreeritakse nende nähtavate nukkude arv, millest sääsk ei koorunud. Suunised väljaarenemise mõõtmise kohta on esitatud 5. liites.

Kasvamine ja elulemus

37. Kui on vaja esitada andmeid vastsete elulemuse ja kasvu kohta kümne päeva jooksul, tuleks katset alustada suurema arvu nõudega, et neid oleks võimalik seejärel kasutada. Kõnealuste täiendavate nõude setteid sõelutakse vastsete saamiseks 250 µm sõela abil. Surma tuvastamise kriteeriumid on liikumatus või reageerimatus mehaanilisele stiimulile. Vastsed, keda ei õnnestunud kätte saada, tuleks samuti surnuks lugeda (vastsed, kes surid katse alguses, võivad olla juba mikroobide poolt lagundatud). Tehakse kindlaks ellujäänud vastsete (tuhavaba) kuivmass katsenõu kohta ja arvutatakse keskmine individuaalne kuivmass nõu kohta. Kasulik on määrata, millisesse kasvujärku ellujäänud vastsed kuuluvad; selleks võib mõõta iga isendi peakapsli laiust.

Analüütilised mõõtmised*Uuritava aine kontsentratsioon*

38. Katse alguses (eelistatavalt tund aega pärast uuritava aine lisamist) ja lõpus tuleb analüüsida suurimal ja väiksemal kontsentratsioonil vähemalt katva veekihi, poorivee ja sette proove. Kõnealused uuritava aine kontsentratsiooni määramised annavad teavet uuritava aine käitumise/jaotumise kohta vee-sette süsteemis. Setteproovi võtmine katse alguses võib katsesüsteemi mõjutada (näiteks katse vastsete eemaldamine), seega tuleks analüütiliste näitajate määramiseks kasutada katse alguses ja katse ajal vajaduse korral täiendavaid katsenõusid (vt punkt 39). Sette mõõtmised ei pruugi olla vajalikud, kui uuritava aine jaotumine vee ja sette vahel on võrreldavates tingimustes (näiteks sette ja vee suhe, lisamise tüüp, sette orgaanilise süsiniku sisaldus) tehtud vee/sette uuringu käigus täpselt määratud.
39. Kui tehakse vahepealseid mõõtmisi (näiteks seitsmendal päeval) või kui analüüsi jaoks on vaja suurt proovi, mida ei saa katsenõust ilma katsesüsteemi mõjutamata võtta, tuleks analüüs teha samal viisil töödeldud, kuid bioogilisteks vaatlusteks mitte kasutatavast täiendavast katsenõust (kus on ka katseorganismid) võetud proovist.
40. Tsentrifugimine näiteks 10 000 g ja 4 °C juures 30 minuti vältel on soovitatav meetod poorivee eraldamiseks. Kui on tõendatud, et uuritav aine ei adsorbeeru filtritele, võib sobida ka filtrimine. Mõnel juhul ei pruugi liiga väikse proovi suuruse tõttu olla võimalik poorivee kontsentratsiooni määramine.

▼ **M4***Füüsikalis-keemilised parameetrid*

41. Katsenõude pH-d, lahustunud hapniku sisaldust katsevees ja temperatuuri tuleks mõõta asjakohasel viisil (vt punkt 10). Katse alguses ja lõpus tuleks kontrollnõudes ja ühes suurima kontsentratsiooniga katsenõus mõõta karedust ja ammoniaaki.

KATSEANDMED JA PROTOKOLLI KOOSTAMINE

Tulemuste töötlemine

42. Kõnealuse katse eesmärk on teha kindlaks uuritava aine mõju isas- ja emas-sääskede arengu kiirusele ja täielikult välja arenenud sääskede koguarvule või kümnepäevase katse korral mõju vastsete elulemusele ja kehamassile. Kui puuduvad andmed sugude statistiliselt erineva tundlikkuse kohta, võib statistilistes analüüsides isaste ja emaste tulemused koondada. Sugude erinevat tundlikkust on võimalik statistiliselt hinnata näiteks χ^2 -r \times 2 tabeli testi abil. Vajaduse korral tuleb kümne päeva möödumisel teha kindlaks vastsete elulemus ja keskmine individuaalne kuivmass nõu kohta.
43. Toimet avaldavad kontsentratsioonid, mis põhinevad katva veekihi kontsentratsioonidel, arvutatakse eelistatavalt katse alguses mõõdetud kontsentratsioonide alusel (vt punkt 38).
44. EC₅₀ või muu EC_x-näitaja arvutamiseks võib tegelike paralleelproovidena kasutada nõude statistikat. Iga EC_x usaldusvahemiku arvutamisel tuleks arvesse võtta eri nõude tulemuste hajumist või tuleks näidata, et kõnealune hajumine on nii väike, et seda võib eirata. Kui andmeid töödeldakse mudeli parameetrite leidmiseks vähimruutude meetodiga, tuleks nõu statistikat teisendada, et dispersioon oleks ühtlasem. EC_x-väärtused tuleks siiski arvutada pärast tulemuse esialgsele väärtusele tagasiteisendamist.
45. Kui statistilise analüüsi eesmärk on teha hüpoteesi katsetamise abil kindlaks tähtsatava toimet kontsentratsioon / vähim tähtsatava toimega kontsentratsioon, tuleb võtta arvesse nõudevahelist hajuvust, näiteks kasutada hierarhilist dispersioonanalüüsi (*nested ANOVA*). Olukorras, kus tavapärased dispersioonanalüüsi (*ANOVA*) eeldused ei ole täidetud, võivad paremini sobida töökindlamad testid (21).

Väljaarenemise määr

46. Väljaarenemise määrad on kõik-või-mitte-midagi-andmed ja neid on võimalik analüüsida astmeliselt kohaldatava Cochran-Armitage'i testi abil, kus eeldatakse, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, ja need andmed on selle eeldusega kooskõlas. Vastasel juhul võib kasutada Fisher'i täpset testi või Manteli-Haenszeli testi Bonferroni-Holmi kohandatud p-väärtustega. Kui on tõendeid, et ühe kontsentratsiooniga paralleelproovide hajuvus on suurem kui eeldatakse binoomjaotuse dispersiooni puhul (nn ekstra-binoomjaotuse dispersioon), tuleks kasutada töökindlat Cochran-Armitage'i või Fisher'i täpset testi, nagu on soovitatud (21).
47. Määratakse nõu kohta välja arenenud sääskede arv n_e , mis jagatakse lisatud vastsete arvuga n_a :

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

▼ **M4**

kus:

ER = väljaarenemise määr

n_e = nõu kohta välja arenenud sääskede arv

n_a = nõu kohta lisatud vastsete arv.

48. Ekstra-binoomjaotuse dispersiooni korral on suurte valimite puhul kõige asjakohasem alternatiiv käsitleda väljaarenemise määra pideva vastusena ning kasutada selliseid meetodeid nagu Williamsi test, kui võib eeldada, et mõju sõltuvus doosist on monotoonne, kui see on kooskõlas kõnealuste väljaarenemise määra andmetega. Kui monotoonsust ei ole, on asjakohane kasutada Dunnetti testi. Suur valim on siinkohal määratletud kui väljaarenenud sääskede arv ja väljaarenemata jäänud sääskede arv, mis mõlemad on suuremad kui viis paralleelproovi (nõu) kohta.
49. Dispersioonanalüüsi (ANOVA) meetodite kohaldamiseks tuleks väljaarenemise määra väärtused kõigepealt teisendada arkussiinus-ruutjuure-teisenduse või Freemani-Tukey teisenduse abil, et saada ligikaudne normaaljaotus ja võrdsustada variatsioonid. Cochran-Armitage'i testi, Fisheri täpse testi (Bonferroni) või Manteli-Haenszeli testi võib kasutada absoluutsete sageduste kasutamisel. Arkussiinus-ruutjuure-teisendust kohaldatakse, arvutades väljaarenemise määra ruutjuure siinuse pöördarvu (\sin^{-1}).
50. Väljaarenemise määrade puhul arvutatakse EC_x -väärtused regressioonanalüüsi (või näiteks probit- (22) või logit-teisenduse, Weibulli meetodi, sobiva müügiloleva tarkvara jne) abil. Kui regressioonanalüüs ebaõnnestub (näiteks kui on vähem kui kaks osalist vastust), kasutatakse muid mitteparameetrilisi meetodeid, näiteks libisev keskmine või lihtne interpolatsioon.

Arengu kiirus

51. Keskmine arengu aeg väljendab keskmist ajavahemikku vastsete lisamise (katse päev 0) ja sääskede katsekohordi tekke vahel. (Tegeliku arenguaja arvutamiseks tuleks arvesse võtta vastsete vanust lisamise ajal.) Arengu kiirus on pöördvõrdeline arengu ajaga (ühik: 1/päev) ja väljendab vastsete arengu seda osa, mis toimub ühe päeva jooksul. Kõnealuste sette mürgisuse hindamise uuringute puhul eelistatakse arengu kiirust, kuna selle dispersioon on väiksem, homogensem kui arenguaja puhul ja lähedasem normaaljaotusele. Seega võib arengu kiiruse puhul kasutada tugevaid parameetrilisi testimismeetodeid, mida ei saa kasutada arenguaja puhul. Arengu kiiruse kui pideva vastuse jaoks saab EC_x -väärtusi hinnata regressioonanalüüsiga (näiteks 23, 24).
52. Järgmiste statistiliste testide puhul eeldatakse, et kontrolli päeval x täheldatud sääsed on välja arenenud keskmisel ajavahemikul päeva x ja päeva $x - 1$ vahel (1 = kontrollimiste vahelise ajavahemiku pikkus, tavaliselt üks päev). Keskmine arengu kiirus nõu kohta (\bar{x}) arvutatakse järgmise võrrandi alusel:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

kus:

\bar{x} – keskmine arengu kiirus nõu i kohta

i – kontrollivahemiku indeks

m – kontrollivahemike maksimaalne arv

▼ M4

f_i – kontrollivahemikul i välja arenenud sääskede arv

n_e – katse lõpuks välja arenenud sääskede koguarv ($= \sum f_i$)

x_i – ajavahemikul i välja arenenud sääskede arengu kiirus,

$$x_i = 1 / \left(\text{day}_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

kus:

day_i (päev) – kontrolli päev (lisamisest möödunud päevade arv)

l_i – kontrollivahemiku pikkus i (päevades, tavaliselt üks päev).

Katseprotokoll

53. Katseprotokollis tuleks esitada vähemalt järgmine teave.

Uuritav aine:

- füüsikaline olek ja vajaduse korral füüsikalise-keemilised omadused (lahustuvus vees, aururõhk, jaotustegur mullas (või settes, kui see on määratud), stabiilsus vees jne);
- kemikaali tunnusandmed (üldkasutatav nimetus, keemiline nimetus, struktuurivalem, CASi number jne), sh puhtus ja uuritava aine kvantitatiivse analüüsi meetod.

Katseorganismi liik:

- kasutatud katseloom: liik, teaduslik nimetus, organismide päritolu ja kasvatustingimused;
- teave munamasside ja vastsete käsitlemise kohta;
- katseloomade vanus katsenõudesse sisestamise ajal.

Katsetingimused:

- kasutatud sete, s.o looduslik või spetsiaalselt koostatud sete;
- loodusliku sette puhul setteproovi võtmise koha asukoht ja kirjeldus, sh võimaluse korral saastumise ajalugu; omadused: pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, süsiniku-lämmastiku suhe ja granulomeetria (kui see on asjakohane);
- spetsiaalselt koostatud sette valmistamine: koostisosad ja omadused (orgaanilise süsiniku sisaldus, pH, niiskus jne katse alguses);
- katsevee valmistamine (kui kasutatakse taastatud vett) ja omadused (hapnikusisaldus, pH, elektrijuhtivus, karedus jne katse alguses);
- settekihi ja katva veekihi paksus;
- katva veekihi ja poorivee maht; märja sette kaal koos pooriveega ja ilma selleta;
- katsenõud (materjal ja suurus);
- põhilahuse valmistamise meetod ja uuritud kontsentratsioonide saamine;

▼ **M4**

- uuritava aine manustamine: kasutatud kontsentratsioonid, paralleelproovide arv ja lahusti kasutamine, kui seda tehti;
- inkubatsioonitingimused: temperatuur, valgustusperiood ja valguse intensiivsus, aereerimine (sagedus ja intensiivsus);
- üksikasjalik teave söötmise kohta, sh sööda tüüp, valmistamine, kogus ja söötmise ajakava.

Tulemused:

- nominaalsed katsekonsentratsioonid, mõõdetud katsekonsentratsioonid ja kõigi analüüside tulemused, millega määrati uuritava aine kontsentratsiooni katsenõus;
- vee kvaliteet katsenõus, s.o pH, temperatuur, lahustunud hapnik, karedus ja ammoniaak;
- aurustunud katsevee asendamine, kui seda tehti;
- väljaarenenud isas- ja emassäskede arv iga nõu ja iga päeva kohta;
- iga nõu kohta nende vastsete arv, kellest sääski ei arenenud;
- vastsete keskmine individuaalne kuivmass iga nõu ja kasvujärgu kohta, kui see on asjakohane;
- valmikute väljaarenemise protsent iga paralleelproovi ja katsekonsentratsiooni kohta (isas- ja emassäsed kokku);
- täielikult väljaarenenud sääskede keskmine arengu kiirus iga paralleelproovi ja katsekonsentratsiooni kohta (isas- ja emassäsed kokku);
- mürgisuse näitajate hinnangud, näiteks EC_x (ja selle usaldusvahemik), täheldatava toimeteta kontsentratsioon ja/või vähim täheldatava toimega kontsentratsioon ning nende määramiseks kasutatud statistilised meetodid;
- tulemuste arutelu, kaasa arvatud käesolevast katsemeetodist kõrvalekaldumise võimalik mõju katsetulemustele.

KIRJANDUS

- 1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.
- 2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to them European Commission. Report No: EC 3738. August 1994. WRc, UK.
- 3) SETAC (1993). Guidance Document on Sediment toxicity Tests and Bioassays for Freshwater and Marine Environments. From the WOSTA Workshop held in the Netherlands.
- 4) ASTM International/E1706-00 (2002). Test Method for Measuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. pp 1125-1241. In ASTM International 2002 Annual Book of Standards. Volume 11.05. Biological Effects and Environmental Fate; Biotechnology; Pesticides. ASTM International, West Conshohocken, PA.
- 5) Environment Canada (1997). Test for Growth and Survival in Sediment using Larvae of Freshwater Midges (*Chironomus tentans* or *Chironomus riparius*). Biological Test Method. Report SPE 1/RM/32. December 1997.
- 6) US-EPA (2000). Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. Second edition. EPA 600/R-99/064. March 2000. Revision to the first edition dated June 1994.

▼ **M4**

- 7) US-EPA/OPPTS 850.1735. (1996): Whole Sediment Acute Toxicity Invertebrates.
- 8) US-EPA/OPPTS 850.1790. (1996): Chironomid Sediment toxicity Test.
- 9) Milani D, Day KE, McLeay DJ, Kirby RS (1996). Recent intra- and inter-laboratory studies related to the development and standardisation of Environment Canada's biological test methods for measuring sediment toxicity using freshwater amphipods (*Hyaella azteca*) and midge larvae (*Chironomus riparius*). Technical Report. Environment Canada. National Water Research Institute. Burlington, Ontario, Canada.
- 10) Sugaya Y (1997). Intra-specific variations of the susceptibility of insecticides in *Chironomus yoshimatsui*. Jp. J. Sanit. Zool. 48 (4): 345–350.
- 11) Kawai K (1986). Fundamental studies on Chironomid allergy. I. 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) Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.
- 15) Suedel BC and Rodgers JH (1994). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing. Environ. Toxicol. Chem. 13: 1163–1175.
- 16) Naylor C and Rodrigues C (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. Chemosphere 31: 3291–3303.
- 17) Dunnett CW (1964). A multiple comparisons procedure for comparing several treatments with a control. J. Amer. Statis. Assoc. 50: 1096–1121.
- 18) Dunnett CW (1964). New tables for multiple comparisons with a control. Biometrics 20: 482–491.
- 19) Williams DA (1971). A test for differences between treatment means when several dose levels are compared with a zero dose control. Biometrics 27: 103–117.
- 20) Williams DA (1972). The comparison of several dose levels with a zero dose control. Biometrics 28: 510–531.
- 21) Rao JNK and Scott AJ (1992). A simple method for the analysis of clustered binary data. Biometrics 48:577–585.
- 22) Christensen ER (1984). Dose-response functions in aquatic toxicity testing and the Weibull model. Water Research 18: 213–221.
- 23) Bruce and Versteeg (1992). A statistical procedure for modelling continuous toxicity data. Environmental Toxicology and Chemistry 11:1485–1494.
- 24) Slob W (2002). Dose-response modelling of continuous endpoints. Toxicol. Sci. 66: 298–312.

▼ **M4**

1. liide

MÕISTED

Käesolevas katsemeetodis kasutatakse järgmisi mõisteid järgmises tähenduses:

spetsiaalselt koostatud sete (ehk taastatud, tehislik või sünteetiline sete) – selliste materjalide segu, mida kasutatakse loodusliku sette füüsiliste koostisosade imiteerimiseks;

kattev veekiht – vesi, mis pannakse katsenõus sette peale;

poorivesi – sette- või mullaosakeste vahelises ruumis olev vesi;

rikastatud vesi – katsevesi, millele on lisatud uuritavat ainet;

uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M4**

2. liide

Chironomus riparius'e kasvatamist käsitlevad soovitused

1. *Chironomus* 'e vastseid võib kasvatada kristallisatsiooninõus või suuremas mahutis. Mahuti põhi kaetakse ligikaudu 5–10 mm paksuse peene kvartsi-liiva kihiga. Diatomiit (näiteks Merck, Art 8117) on samuti tõendatult sobiv substraat (piisab õhemast kihist, isegi mõnest millimeetrist). Seejärel lisatakse sobivat vett mitme cm paksuse kihina. Vett tuleks vajaduse korral lisada aurumiskadude asendamiseks ja kuivamise vältimiseks. Vee võib vajaduse korral välja vahetada. Tuleks tagada kerge aereerimine. Vastsete kasvatamise nõusid tuleks hoida vastavas puuris, millega takistatakse väljaarenenud täiskasvanud isendite väljapääsu. Puur peaks olema piisavalt suur, et võimaldada väljaarenenud valmikute parvedesse kogunemist, vastasel juhul ei pruugi toimuda paljunemist (miinimumsuurus on ligikaudu 30 × 30 × 30 cm).
2. Puure tuleks hoida toatemperatuuril või püsiva keskkonnaga ruumis temperatuuril 20 ± 2 °C 16-tunnise valgustusperioodiga (intensiivsus ligikaudu 1 000 luksi) ja kaheksa tunni pimedusega. On teada, et vähem kui 60 %-line suhteline õhuniiskus võib paljunemist takistada.

Lahjendusvesi

3. Võib kasutada mis tahes looduslikku või sünteetilist vett. Enamasti kasutatakse kaevuvett, dekllooritud kraanivett ja tehislikke kasvukeskkondi (näiteks Elendti kasvukeskkond M4 või M7, vt allpool). Vett tuleb enne kasutamist aereerida. Vajaduse korral võib kultuuri kasvuvett uuendada, eemaldades kasutatud vee kultuuri kasvunõudest ettevaatlikult valamise teel või sifooniga, kahjustamata vastsete kestasid.

Vastsete söötmine

4. *Chironomus* 'e vastseid tuleks sööta helbelise kalasöödaga (TetraMin®, TetraPhyll® või muu samalaadne kaubanduslik kalasööda tootemark) koguses ligikaudu 250 mg nõu kohta päevas. Sööta võib anda kuiva jahvatatud pulbrina või suspensioonina vees: 1,0 g helbelist kalasööta lisatakse 20 ml lahjendusveele ja see segatakse homogeense segu saamiseni. Seda preparaati võib sööta koguses 5 ml nõu kohta päevas (preparaati tuleks enne kasutamist loksutada). Vanemad vastsed võivad vajada rohkem sööta.
5. Söötmist kohandatakse vee kvaliteediga. Kui kultuuri kasvukeskkond muutub häguseks, tuleks sööda hulka vähendada. Sööda lisamist tuleb hoolikalt jälgida. Liiga vähe sööta põhjustab vastsete rände veesamba suunas ning liiga palju sööta hoogustab mikroobide tegevust ja vähendab vee hapnikusisaldust. Mõlemad tingimused võivad vähendada kasvu kiirust.
6. Uute kultuuri kasvunõude valmisseedmisel võib lisada ka mõne rohevetika (näiteks *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) rakke.

Väljaarenenud valmikute söötmine

7. Mõned teadlased on soovitanud väljaarenenud valmikute söötmiseks kasutada küllastunud sahharoosilahuses niisutatud puuvillast lappi.

▼ **M4****Väljaarenemine**

8. Ligikaudu 13–15 päeva möödumisel hakkavad temperatuuril 20 ± 2 °C vastsete kasvatamise nõudest väljuma valmikud. Isased on tänu sulgjatele tundlatele kergesti äratuntavad.

Munamassid

9. Kui valmikud on paljundamispuuris, tuleks kõiki vastsete kasvatamise nõusid kontrollida kolm korda nädalas sinna želatiinjate munamasside lisandumise suhtes. Kui leitakse munamass, tuleks see hoolikalt kõrvaldada. See tuleks üle kanda väiksele tassile, mis sisaldab paljundusvee proovi. Munamasse kasutatakse uue kasvunõu kasutusele võtmiseks (näiteks 2–4 muna-massi nõu kohta) või mürgisuse katsetes.
10. Esimese kasvujärgu vastsed peaksid kooruma 2–3 päeva pärast.

Uute kasvunõude ülesseadmine

11. Kui kultuurid on loodud, peaks iga nädal (või katsenõuetest olenevalt väiksema sagedusega) olema võimalik vastsete uute kasvunõude ülesseadmine, kõrvaldades vanemad nõud pärast täiskasvanud sääskede väljaarenemist. Seda süsteemi kasutades saadakse minimaalse vaevaga regulaarne valmikute varu.

Katselahuste M4 ja M7 valmistamine

12. Elendt (1990) on kirjeldanud kasvukeskkonda M4. Kasvukeskkond M7 valmistatakse samal viisil kui kasvukeskkond M4, v.a tabelis 1 nimetatud ainete puhul, mille kontsentratsioon kasvukeskkonnas M7 on kasvukeskkonnaga M4 võrreldes neli korda väiksem. Kasvukeskkonda M7 käsitlev artikkel on kirjutamisel (Elendt, isiklik teade). Katselahust ei tohiks koostada Elendti ja Biasi (1990) järgi, kuna põhilahuste valmistamiseks ei ole antud $\text{NaSiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 ja K_2HPO_4 kontsentratsioon sobiv.

Kasvukeskkonna M7 valmistamine

13. Iga põhilahus (I) valmistatakse eraldi ja kombineeritud põhilahus (II) valmistatakse kõnealustest põhilahustest (I) (vt tabel 1). Kasvukeskkonna M7 valmistamiseks võetakse 50 ml kombineeritud põhilahust (II), lisatakse iga makrotoitainine põhilahuse kogused, mis on esitatud tabelis 2, ja täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini. Vitamiinide põhilahuse valmistamiseks lisatakse deioniseeritud veele kolme vitamiini, nagu on näidatud tabelis 3, ja lõplikule M7 kasvukeskkonnale lisatakse vahetult enne selle kasutamist 0,1 ml kombineeritud vitamiinide põhilahust. (Vitamiinide põhilahust säilitatakse külmutatult väikeste alikvootidena). Kasvukeskkonda aereeritakse ja see stabiliseeritakse.

Tabel 1

Kasvukeskkondade M4 ja M7 mikroelementide põhilahused

Põhilahus (I)	Kogus (mg), mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitrini	Kombineeritud põhilahuse (II) valmistamiseks: segage põhilahuste (I) järgmised kogused (ml) ja täiendage need 1 liitrini deioniseeritud veega		Lõppkontsentratsioonid katselahustes (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
H_3BO_3 ⁽¹⁾	57 190	1,0	0,25	2,86	0,715
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	7 210	1,0	0,25	0,361	0,090
LiCl ⁽¹⁾	6 120	1,0	0,25	0,306	0,077

▼ **M4**

Põhilahus (I)	Kogus (mg), mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitriini	Kombineeritud põhilahuse (II) valmistamiseks: segage põhilahuse (I) järgmised kogused (ml) ja täiendage need 1 liitriini deioniseeritud veega		Lõppkontsentratsioonid katselahustes (mg/l)	
		M4	M7	M4	M7
RbCl ⁽¹⁾	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
SrCl ₂ · 6 H ₂ O ⁽¹⁾	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O ⁽¹⁾	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
CuCl ₂ · 2 H ₂ O ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl ₂	260	1,0	1,0	0,013	0,013
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na ₂ SeO ₃	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH ₄ VO ₃	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
Na ₂ EDTA · 2 H ₂ O ^{(1) (2)}	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
FeSO ₄ · 7 H ₂ O ^{(1) (2)}	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Need ained on M4 ja M7 puhul erinevad, nagu on eespool viidatud.

⁽²⁾ Need lahused valmistatakse eraldi, valatakse seejärel kokku ja autoklaavatakse viivitamata.

Tabel 2

Kasvukeskkondade M4 ja M7 makrotoitainete põhilahused

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitriini (mg)	Kasvukeskkonna M4 ja M7 valmistamiseks lisatav makrotoitainete põhilahuste kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	293 800	1,0	293,8
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO ₃	64 800	1,0	64,8
NaSiO ₃ · 9 H ₂ O	50 000	0,2	10,0
NaNO ₃	2 740	0,1	0,274
KH ₂ PO ₄	1 430	0,1	0,143
K ₂ HPO ₄	1 840	0,1	0,184

▼ **M4**

Tabel 3

Kasvukeskkondade M4 ja M7 vitamiinide põhilahus

Ühe vitamiinide põhilahuse valmistamiseks valatakse kokku kõik kolm vitamiinilahust.

	Kogus, mis täiendatakse deioniseeritud veega 1 liitri (mg)	Kasvukeskkonna M4 ja M7 valmistamiseks lisatav vitamiinide põhilahuse kogus (ml/l)	Lõppkontsentratsioonid katselahustes M4 ja M7 (mg/l)
Tiamiinvesinikkloriid	750	0,1	0,075
Tsüanokobalamiin (B12)	10	0,1	0,0010
Biotiin	7,5	0,1	0,00075

KIRJANDUS

BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Streloke and H. Köpp. Berlin 1995.

Elendt BP (1990). Selenium Deficiency in Crustacean. *Protoplasma* 154: 25–33.

Elendt BP and Bias W-R (1990). Trace Nutrient Deficiency in *Daphnia magna* 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**

3. liide

SPETSIAALSELT KOOSTATUD SETTE VALMISTAMINE

Sette koostis

Spetsiaalselt koostatud sette koostis peaks olema järgmine:

Koostisosa	Kirjeldus	Sette kuivmassi protsent
Turvas	Turbasamblaturvas, mille pH on võimalikult lähedal vahemikule 5,5–6,0, nähtavad taimeosad puuduvad, peeneks jahvatatud (osakese suurus ≤ 1 mm) ja õhu käes kuivatatud	4–5
Kvartsiiv	Tera suurus: > 50 % osakes-test peaksid olema vahemikus 50–200 µm	75–76
Kaoliinsavi	Kaoliniidisaldus ≥ 30 %	20
Orgaaniline süsinik	Reguleeritakse turba ja liiva lisamisega	2 (±0,5)
Kaltsiumkarbonaat	CaCO ₃ , pulbriks jahvatatud, keemiliselt puhas	0,05–0,1
Vesi	Juhtivus ≤ 10 µS/cm	30–50

Valmistamine

Turvas kuivatatakse õhu käes ja jahvatatakse peeneks pulbriks. Valmistatakse vajaliku turbapulbrikoguse suspensioon deioniseeritud vees, kasutades tõhusat homogenisaatorit. Selle suspensiooni pH reguleeritakse CaCO₃ abil vahemikku 5,5 ± 0,5. Suspensiooni konditsioneeritakse vähemalt kaks päeva temperatuuril 20 ± 2 °C kerge segamisega, et stabiliseerida pH ja luua stabiilne mikroobikomponent; pH mõõdetakse uuesti ja see peaks olema 6,0 ± 0,5. Seejärel segatakse turba suspensioon muude koostisosadega (liiv ja kaoliinsavi) ning deioniseeritud veega, et saada homogeenne sete, mille veesisaldus on vahemikus 30–50 % sette kuivmassist. Lõpliku segu pH mõõdetakse uuesti ja see reguleeritakse vajaduse korral CaCO₃ abil vahemikku 6,5–7,5. Kuivmassi ja orgaanilise süsiniku sisalduse määramiseks võetakse sette proovid. Enne, kui spetsiaalselt koostatud setet kasutatakse surusääsklastele mürgisuse katses, on soovitatav seda seitsme päeva jooksul konditsioneerida samades tingimustes, mis valdavalt esinevad edasise katse käigus.

Säilitamine

Tehisliku sette valmistamiseks kasutatavaid kuivi koostisosi võib säilitada kuivas ja jahedas kohas toatemperatuuril. Spetsiaalselt koostatud (märga) setet ei tohiks enne selle katses kasutamist säilitada. Seda tuleks kasutada viivitamata pärast seitsmepäevast kohandamisperioodi, millega selle valmistamine lõpetatakse.

KIRJANDUS:

Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.

Meller M, Egeler P, Rombke J, Schallnass H, Nagel R, Streit B (1998). Short-term Toxicity of Lindane, Hexachlorobenzene and Copper Sulfate on Tubificid Sludgeworms (*Oligochaeta*) in Artificial Media. *Ecotox. and Environ. Safety* 39: 10–20.

▼ **M4**

4. liide

Kasutuskõlbliku lahjendusvee keemilised omadused

Aine	Kontsentratsioonid
Tahked osakesed	< 20 mg/l
Orgaanilise süsiniku kogusisaldus	< 2 mg/l
Ioniseerimata ammoniaak	< 1 µg/l
Karedus CaCO ₃ -na	< 400 mg/l (*)
Jääkkloor	< 10 µg/l
Fosfororgaaniliste pestitsiidide üldsisaldus	< 50 ng/l
Kloororgaaniliste pestitsiidide ja polüklooritud bifenüülid üldsisaldus	< 50 ng/l
Orgaanilise kloori üldsisaldus	< 25 ng/l

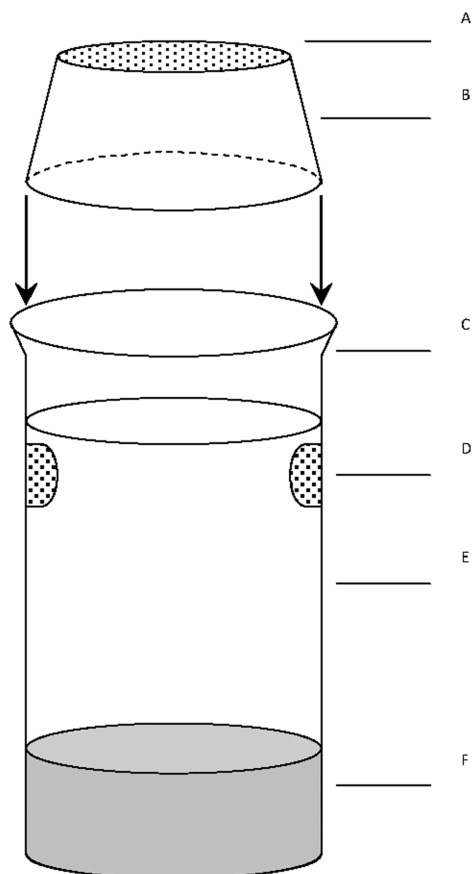
(*) Kui kahtlustatakse karedust tekitavate ionide ja uuritava aine omavahelist mõju, tuleks kasutada väiksema karedusega vett (ja seega ei tohiks nimetatud olukorras kasutada Elendti kasvukeskkonda M4).

▼ **M4**

5. liide

Suunised surusääsklaste vastsete valmikuteks väljaarenemise seireks

Katsenõudele paigaldatakse väljaarenenud valmikute püüdurid. Neid püüdreid vajatakse alates 20. päevast kuni katse lõpuni. Kasutatava püüduri näidis on esitatud allpool.



A – nailonvõrk

B – tagurpidi pööratud plastiktopsid

C – tilata kokkupuutenõu

D – sõelaga kaetud veevahetusavad

E – vesi

F – sete

▼M4

C.29. KIIRE BIOLAGUNDATAVUS – CO₂ SULETUD NÕUDES
(VABARUUMI KATSE)

SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 310 (2006). Käesolev katsemeetod on sõelumismeetod kemikaalide kiire biolagundatavuse hindamiseks ning see annab samalaadset teavet kui käesoleva lisa peatüki C.4 meetoditena C.4-A kuni C.4-F kirjeldatud kuus katsemeetodit. Seega võib käesoleva katsemeetodi alusel positiivse tulemuse saanud kemikaali pidada kiiresti biolagundatavaks ning seepärast ka keskkonnas kiiresti lagunevaks.

2. Halvasti lahustuvate ja tugevasti adsorbeeruvate kemikaalide uurimisel on esimene valik tavaliselt olnud süsinikdioksiidi (CO₂) meetod (1), mida kasutatakse juba ammu ja mis põhineb Sturmil algse katsel (2), millega hinnatakse orgaaniliste kemikaalide biolagundatavust mikroobide toimel moodustunud süsinikdioksiidi mõõtmise teel. Seda on samuti kasutatud lahustuvate (kuid mitte lenduvate) kemikaalide puhul, kuna süsinikdioksiidi teket peavad paljud ainsaks kindlaks tõendiks mikroobide tegevuse kohta. Lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist võivad põhjustada füüsikalised-keemilised protsessid (adsorbeerumine, lendumine, sadestumine, hüdroolüüs) ning ka mikroobide tegevus ja mõned mittebioloogilised hapniku sidumise reaktsioonid; harva tekib CO₂ orgaanilistest kemikaalidest abiootilisel teel. Algse ja muudetud Sturmil katses (1, 2) kõrvaldatakse CO₂ vedelfaasist absorbeerimisnõudesse läbipuhumisega (s.o CO₂ kõrvaldamiseks töödeldud õhu barboteerimisega läbi vedeliku), aga Larsonil versioonis (3, 4) kantakse CO₂ reaktsiooninõust üle absorbeerijasse CO₂-vaba õhu suunamisega läbi vabaruumi ja katsenõu pideva raputamisega. Reaktsiooninõud raputatakse ainult Larsonil muudetud versiooni puhul; segamine on standardis ISO 9439 (5) ette nähtud ainult lahustumatute ainete puhul ja algse Ameerika Ühendriikide versioonis (6), mõlemas kasutatakse vabaruumi õhu asendamise asemel läbipuhumist. Teises Ameerika Ühendriikide keskkonnakaitseametil meetodis (7), mis põhineb Gledhillil meetodil (8), on raputatav reaktsiooninõu keskkonnast isoleeritud ja tekkiv CO₂ kogutakse otse gaasifaasist sisemisse leelispuudurisse nagu klassikalistes Warburgi-Barcrofti respiromeetri kolbides.

3. Mitme kemikaali puhul on näidatud, et standardse muudetud Sturmil katse kasutamisel koguneb anorgaaniline süsinik kasvukeskkonda (9). Aniliini (kontsentratsioon 20 mg C/l) lagundamisel leiti anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon olevat lausa 8 mg/l. Seega ei väljenda leelispuudurisse kogutud CO₂ lagunemise ajal mikrobioloogiliselt tekkinud CO₂ tegelikku kogust. Järelikult ei ole uuritava kemikaali kiiresti biolagunevaks klassifitseerimise tingimus, et > 60 % maksimaalsest teoreetiliselt tekkida võivast CO₂ kogusest tuleb koguda kümnepäevase ajavahemiku vältel (10 % biolagunemise saavutamisele vahetult järgnevad kümme päeva), täidetud mõne kemikaali puhul, mis lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise alusel klassifitseeritaks kiiresti biolagunevaks.

4. Kui lagunemise protsent on eeldatavast väiksem, võib anorgaaniline süsinik olla kogunenud katselahusesse. Sel juhul võib lagunemist hinnata muude kiire biolagundatavuse katsete abil.

▼M4

5. Muud Sturmiga meetodi puudused (keerukas, aeganõudev, suurem katsevea tekke tõenäosus, mitte kasutatav lenduva kemikaali puhul) sundisid varem otsima gaasi läbijuhtimise asemele Gledhilli meetodile alternatiivset suletud nõu meetodit (10, 11). Boatman *et al.* (12) vaatasid varasemad meetodid läbi ja võtsid kasutusele suletud vabaruumi süsteemi, milles CO₂ lasti inkubatsiooni lõpus kasvukeskkonna hapestamise teel vabaruumi. CO₂ mõõdeti gaaskromatograafia / anorgaanilise süsiniku analüüsi abil vabaruumist automaatselt võetud proovides, aga vedelfaasis lahustunud anorgaanilist süsinikku ei võetud arvesse. Kasutatud nõud olid väga väikesed (20 ml) ja sisaldasid ainult 10 ml kasvukeskkonda, mis tekitab raskusi; näiteks oli raske lisada lahustumatu uuritava kemikaali vajalikku väga väikest kogust ja/või inokuleeritud kasvukeskkonnas ei pruukinud olla piisavalt või üldse mikroorganisme, kes suudavad uuritavat kemikaali lagundada.

6. Need probleemid on ületatud Struijsi ja Stoltenkampi (13) ning Birchi ja Fletcheri (14) sõltumatute uuringutega. Viimati nimetatud autoreid inspireerisid nende kogemused seadmega, mida kasutati anaeroobse biolagunemise katses (15). Esimesena nimetatud meetodi (13) kohaselt mõõdeti CO₂ vabaruumis pärast hapestamist ja tasakaalustamist ning teise meetodi (14) puhul mõõdeti lahustunud anorgaaniline süsinik nii gaasilises kui ka vedelfaasis ilma töötlemiseta; üle 90 % tekkinud anorgaanilisest süsinikust leiti vedelfaasis. Mõlemal meetodil on eeliseid Sturmiga katse ees, kuna nende katse-süsteem on kompaktsem ja lihtsamini kasutatav, saab uurida ka lenduvaid kemikaale ning tekkinud CO₂ mõõtmise viivituste võimalus on välditud.

7. Kaks nimetatud lähenemisviisi on ühendatud ISO vabaruumi CO₂ standardmeetodis (16), millega on tehtud laboritevaheline võrdluskatse (17), nimetatud standardmeetod on käesoleva katsemeetodi alus. Samal viisil on Ameerika Ühendriikide keskkonnakaitseametis meetodis (18) kasutatud kahte lähenemisviisi. Soovitatakse CO₂ mõõtmise kahte meetodit, nimelt vabaruumi CO₂ pärast hapestamist (13) ja anorgaaniline süsinik vedelfaasis pärast leelise liia lisamist. Viimati nimetatud meetodi võttis kasutusele Peterson naftaettevõtjate Euroopa assotsiatsiooni keskkonna ning tööhutuse ja töötõrvisohu toetamiseks (CONCAWE) tehtud kõnealuse vabaruumi meetodi (mida on muudetud iseenesliku biolagunemise mõõtmiseks) laboritevahelise võrdluskatse ajal (19). Käesoleva lisa peatükis C.4 esitatud kiire biolagundatavuse meetodite läbivaatamisega seoses 1992. aastal tehtud muudatused (20) on kaasatud käesolevasse katsemeetodisse ja seega on tingimused (kasvukeskkond, kestus jne) muudel puhkudel samad kui läbivaadatud Sturmiga katses (20). Birch ja Fletcher (14) on näidanud, et käesoleva vabaruumi katsega väga sarnased tulemused saadi läbivaadatud katsemeetodite OECD laboritevahelises võrdluskatses samade kemikaalidega (21).

KATSE PÕHIMÕTE

8. Uuritavat kemikaali, tavaliselt 20 mg C/l, kui ainsat süsiniku ja energia allikat inkubeeritakse puhvermineraalsoolade kasvukeskkonnas, millesse on külvatud mikroorganismide segapopulatsioon. Katse tehakse suletud pudelites, milles on vaba ruum õhu jaoks; see tagab hapnikuvaru aeroobseks biolagunemiseks. Uuritava kemikaali täielikust aeroobsest biolagunemisest põhjustatud CO₂ teke määratakse sel viisil, et mõõdetakse katsepudelites tekkinud anorgaaniline süsinik ja lahutatakse sellest inokuleerimata kasvukeskkonda sisalduvatest kontrollkatse nõudes tekkinud anorgaaniline süsinik. Biolagunemise ulatus väljendatakse protsendina anorgaanilise süsiniku tekkimise maksimaalsest teoreetilisest kogusest, mis arvutatakse algselt lisatud uuritava kemikaali (orgaanilise süsiniku) koguse alusel.

9. Võimalik on mõõta ka lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamise määra ja/või uuritava kemikaali esase biolagunemise ulatust (20).

▼M4

ANDMED UURITAVA KEMIKAALI KOHTA

10. Lagunemise protsendi arvutamiseks peab uuritava kemikaali orgaanilise süsiniku sisaldus (massiprotsent) olema teada kas selle keemilise struktuuri põhjal või mõõtmise teel. Lenduva uuritava kemikaali puhul aitab mõõdetud või arvatud Henry seaduse konstant leida sobiva vabaruumi ja vedeliku koguse suhte. Sobiva katsekonsentratsiooni valimiseks ning halba biolagundavust näitavate tulemuste tõlgendamiseks on kasulik omada teavet uuritava kemikaali mürgisuse kohta mikroorganismidele: kui ei ole teada, kas uuritav kemikaal inhibeerib mikroobide tegevust, soovitatakse kaasata inhibitsiooni kontrollrühm (vt punkt 24).

MEETODI KASUTUSALA

11. Katset kasutatakse nii vees lahustuvate kui ka mittelahustuvate uuritavate kemikaalide puhul, kuid tuleks tagada uuritava kemikaali hea dispersioon. Soovitatud vabaruumi ja vedeliku koguse suhte 1 : 2 kasutamisel on võimalik uurida lenduvaid kemikaale Henry seaduse konstandiga kuni $50 \text{ Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, kuna vabaruumis oleva uuritava kemikaali osakaal ei ületa sel juhul veel 1 % (13). Lenduvama kemikaali uurimisel võib kasutada väiksemat vabaruumi, aga piiravaks teguriks võib olla selle biosaadavus, eriti kui kemikaal on vees halvasti lahustuv. Kasutaja peab siiski tagama, et vabaruumi ja vedeliku koguse suhte ning uuritava kemikaali kontsentratsioon on sellised, et täieliku aeroobse biolagunemise toimumiseks oleks piisavalt hapnikku (vältige näiteks substraadi suure kontsentratsiooni ja väikse vabaruumi mahu kasutamist). Suuniseid selle kohta võib leida väljaannetes (13, 23).

VÕRDLUSKEMIKAALID

12. Katse korrektse läbiviimise kontrollimiseks tuleks paralleelselt katsetada teadaoleva biolagunevusega võrdluskemikaali. Vees lahustuva uuritava kemikaali katsetamisel võib selleks kasutada aniliini, naatriumbensoaati või etüleenglükooli ja halvasti lahustuva uuritava kemikaali katsetamisel 1-oktanooli (13). Nimetatud kemikaalide biolagunemine peab 14 päeva jooksul jõudma > 60 %-ni maksimaalsest teoreetiliselt võimalikust anorgaanilise süsiniku kogusest.

REPRODUTSEERITAVUS

13. Meetodi ISO standardi kohases laboritevahelises võrdluskatses (17) saadi soovitatud tingimuste kasutamisel 20 mg C uuritava kemikaaliga liitri kohta järgmised tulemused.

Uuritav kemikaal	Keskmine biolagundamise protsent (28 päeva)	Variatsioonikordaja (%)	Laborite arv
Aniliin	90	16	17
1-oktanool	85	12	14

Katsesisene variatsioon (korratavus) oli aniliini puhul hea ja variatsioonikordajad ei olnud peaaegu üheski katses suuremad kui 5 %. Kahel juhul, kui korratavus oli halvem, oli suurem variatsioon tõenäoliselt põhjustatud suuremahulisest anorgaanilise süsiniku tekkimisest kontrollkatsetes. Korratavus oli 1-oktanooli puhul halvem, kuid jäi 79 % katsete puhul ikkagi alla 10 %. See katsesisene suurem variatsioon võis olla põhjustatud doseerimisvigadest, kuna suletud katsepudelitesse tuli lisada väike kogus (3–4 µl) 1-oktanooli. Uuritava kemikaali väiksema kontsentratsiooni kasutamisel on tulemuseks suuremad variatsioonikordajad, eelkõige kontsentratsioonil, mis on väiksem kui 10 mg C/l. Seda on võimalik osaliselt vältida, vähendades anorgaanilise süsiniku üldkontsentratsiooni inokulumis.

▼ **M4**

14. ELi laboritevahelises võrdluskatses, milles lisati viit pindaktiivset ainet koguses 10 mg C/l (24), saadi järgmised tulemused.

Uuritav kemikaal	Keskmine biolagundamise protsent (28 päeva)	Variatsioonikor-daja (%)	Laborite arv
Tetrapropüleenben-seensulfonaat	17	45	10
Diisooktüül-sulfosukt-sinaat (anioonne)	72	22	9
Heksadetsüültrimetüü-lammooniumkloriid (katioonne) (*)	75	13	10
Isononüülfenool(etok-sülaat), (mitteioonne)	41	32	10
Kookosamiid-propüül-dimetüülhüdrosü-sulfobetaiin (amfoteerne)	60	23	11

(*) Mürgisuse neutraliseerimiseks lisati SiO₂.

Tulemused näitavad, et enamasti oli variatsioon suurem halvemini lagunenud pindaktiivsete ainete puhul. Katsesisene variatsioon oli väiksem kui 15 % enam kui 90 % juhtudest ja suurim variatsioon jäi vahemikku 30–40 %.

MÄRKUS. Enamik pindaktiivseid aineid ei ole individuaalsed ained, vaid kujutavad endast selliste isomeeride, homoloogide jne segu, mis lagunevad pärast erinevaid iseloomulikke ooteperioode ja erineva kineetilise kiirusega. Seetõttu on kõverad „hägused”, venivad, mistõttu ei pruugita kümnapäevase ajavahemiku jooksul jõuda nõutava 60 % väärtuseni, kuigi iga aine eraldi katsetatuna jõuaks kümne päevaga > 60 % väärtuseni. Seda võib täheldada ka muude keerukate segude puhul.

MEETODI KIRJELDUS*Seadmed*

15. Tavalised laboriseadmed ja
- klaasist seerumipudelid, mis on suletud butüülkummist korki ja pealevaltsitava alumiiniumkapsliga. Soovitav suurus on nn 125 ml pudel, mille kogumaht on ligikaudu 160 ml (sel juhul peaks iga pudeli maht olema teadaolevalt 160 ± 1 ml). Kui tulemused vastavad punktides 66 ja 67 kirjeldatud tingimustele, võib kasutada väiksemaid nõusid;
 - süsiniku analüsaator või muu mõtteseade (näiteks gaaskromatograaf) anorgaanilise süsiniku mõõtmiseks;

▼ **M4**

- c) suure täpsusega süstlad gaasi- ja vedelikeproovide võtmiseks;
- d) orbitaalloksuti reguleeritud temperatuuriga keskkonnas;
- e) varustatus CO₂-vaba õhuga; selle tagamiseks juhitakse õhk läbi kaltsiumhüdroksiidi ja naatrium-/kaaliumhüdroksiidi segu graanulite või kasutatakse (soovi korral) gaaside segu koostisega 80 % N₂ ja 20 % O₂ (vt punkt 28);
- f) membraanfiltrimiseseade poori suurusega 0,20–0,45 µm (soovi korral);
- g) orgaanilise süsiniku analüsaator (soovi korral).

Reagentid

16. Kogu katse vältel tuleb kasutada analüütiliselt puhtaid reagente.

Vesi

17. Tuleks kasutada destilleeritud või deioniseeritud vett, mille orgaanilise süsiniku kogusisaldus on ≤ 1 mg/l. See moodustab ≤ 5 % algsest orgaanilise süsiniku sisaldusest, mis lisatakse soovitatud doosi uuritava kemikaaliga.

Mineraalsooli sisaldava kasvukeskkonna põhilahused

18. Põhilahused ja mineraalsooli sisaldav kasvukeskkond on samalaadsed kui standardis ISO 14593 (16) ja meetodi C.4 kiire biolagundatavuse katsetes (20). Suurema ammooniumkloriidi kontsentratsiooni kasutamine (2,0 g/l 0,5 g/l asemel) peaks olema vajalik ainult väga erandlikel juhtudel, näiteks siis, kui uuritava kemikaali kontsentratsioon on > 40 mg C/l. Põhilahuseid tuleks säilitada jahutatult ja need tuleks ära visata kuue kuu möödumisel või varem, kui esineb sadestumise või mikroobide kasvu märke. Valmistatakse järgmised põhilahused:

- a) kaaliumdivesinikfosfaat (KH₂PO₄) 8,50 g;

dikaaliumvesinikfosfaat (K₂HPO₄) 21,75 g;

dinaatriumvesinikfosfaatdihüdraat (Na₂HPO₄·2H₂O) 33,40 g;

ammooniumkloriid (NH₄Cl) 0,50 g.

Lahustage vees ja lisage vett 1 liitrini. Lahuse pH peaks olema 7,4 (±0,2). Kui see ei ole nii, tuleks valmistada uus lahus;

- b) kaltsiumkloriidihüdraat (CaCl₂·2H₂O) 36,40 g.

Lahustage vees ja lisage vett 1 liitrini;

- c) magneesiumsulfaatheptahüdraat (MgSO₄·7H₂O) 22,50 g.

Lahustage vees ja lisage vett 1 liitrini;

- d) raud(III)kloriidheksahüdraat (FeCl₃·6H₂O) 0,25 g.

Lahustage vees ja lisage vett 1 liitrini ning lisage üks tilk kontsentreeritud HCl.

Mineraalse kasvukeskkonna valmistamine

19. Segage 10 ml lahust a ligikaudu 800 ml veega (punkt 17), seejärel lisage 1 ml lahuseid b, c ja d ning lisage vett 1 liitrini (punkt 17).

Muud reagentid

20. Kontsentreeritud ortofosforhape (H₃PO₄) (> 85 massiprotsenti).

▼M4

Naatriumhüdroksiidi lahus 7M

21. Lahustage 280 g naatriumhüdroksiidi (NaOH) 1 liitris vees (punkt 17). Määrake saadud lahuses lahustunud anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon ja võtke seda näitajat katsetulemuse arvutamisel arvesse (vt punktid 55 ja 61), pidades eelkõige silmas punktis 66 esitatud kehtivuse kriteeriumi (b). Kui lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsioon on liiga suur, siis valmistage uus lahus.

Uuritav kemikaal

22. Valmistage vees (punkt 17) või kasvukeskkonnas (punkt 19) vees piisavalt lahustuva uuritava kemikaali põhilahus, mille kontsentratsioon on eelistatavalt 100 korda suurem kui katses kasutatav lõplik kontsentratsioon; vajalik võib olla põhilahuse pH reguleerimine. Põhilahust tuleks lisada mineraalse kasvukeskkonnale, et saada lõplik orgaanilise süsiniku kontsentratsioon vahemikus 2–40 mg C/l, eelistatavalt 20 mg C/l. Kui kasutatakse sellest väiksemat kontsentratsiooni, võib väheneda katse täpsus. Täpse mõõtesüstla abil võib nõudesse lisada lahustuvat või lahustumatut vedelat kemikaali. Halvasti lahustuva või lahustumatu uuritava kemikaali puhul võib vaja minna erimeetodit (25). Valikud on järgmised:

- a) teadaoleva kaalutud koguse otse lisamine;
- b) enne lisamist ultraheliga disperseerimine;
- c) disperseerimine emulgaatoriga; sel juhul tuleb enne lisamist kindlaks teha, kas emulgaator mõjutab (inhibeerib või stimuleerib) mikroobide tegevust;
- d) vedela uuritava kemikaali või sobiva lenduva lahusti abil saadud lahuse adsorbeerimine inertsele kandjale või tugimaterjalile (näiteks klaaskiudfilter), millele järgneb lahusti (kui seda kasutati) aurustamine ja teadaoleva koguse otse lisamine;
- e) teadaolev kogus uuritava kemikaali lahust kergesti lenduvas lahustis viiakse tühja katsenõusse ja aurustatakse seejärel lahusti.

Alapunktide c, d ja e puhul kasutatavaid aineid või lahusteid tuleb katsetada, et teha kindlaks nende võimalik stimuleeriv või inhibeeriv mõju mikroobide tegevusele (vt punkti 42 alapunkt b).

Võrdluskemikaal

23. Valmistage vees (punkt 17) (lahustuva) võrdluskemikaali põhilahus, mille kontsentratsioon on eelistatavalt 100 korda suurem kui katses kasutatav lõplik kontsentratsioon (20 mg C/l).

Inhibeerimise kontroll

24. Uuritavad kemikaalid sageli ei lagune kiire biolagunemise hindamiseks kasutatavates tingimustes. Üks võimalikke põhjusi on see, et uuritav kemikaal inhibeerib katses kasutataval kontsentratsioonil inokulumi. Katseprojekti võib lisada inhibeerimise kontrollkatse, et teha (tagantjärele) kindlaks inhibeerimine kui võimalik põhjus või mõjutav tegur. Alternatiivselt võib inhibeerimise kontrollkatsega kõnealuse mõju välistada ja näidata, et lagunemise puudumine või vähene lagunemine on põhjustatud üksnes vastupidavusest mikroobide rünnakule katse tingimustes. Et saada teavet uuritava kemikaali mürgisuse kohta (aeroobsetele) mikroorganismidele, valmistage katse kasvukeskkonnas lahus, mis sisaldab uuritavat kemikaali ja võrdluskemikaali (punkt 19) vastavalt igal lisatud kontsentratsioonil (vt punktid 22 ja 23).

▼ **M4***Inokulum*

25. Inokulumi saamiseks võib kasutada mitmeid allikaid: aktiivmuda; reovee väljavool (kloorimata); pinnavesi ja muld või nimetatute segu (20). Võrdluskemikaali abil tuleks kontrollida sellise inokulumi biolagundavat toimet. Olenemata lähtematerjalist ei tohiks kasutada uuritava kemikaaliga varem kokku puutunud mikroorganisme, kui meetodit kasutatakse kiire biolagundavuse katsena.

Hoiatus. Aktiivmuda, reovesi ja reovee väljavool sisaldavad haigusetekiitajaid ja neid tuleb käsitleda ettevaatusega.

26. Kogemuste põhjal on optimaalne inokulumi kogus selline, mis
- on piisav asjakohase biolagunemise tagamiseks;
 - lagundab võrdluskemikaali kindlaksmääratud protsendi võrra (vt punkt 66);
 - tagab lõppsegus $10^2 - 10^5$ kolooniaid moodustava ühiku olemasolu milliliitri kohta;
 - tagab aktiivmuda kasutamisel lõppsegus tavaliselt hõljuvaine kontsentratsiooni 4 mg/l, võib kasutada kontsentratsioone kuni 30 mg/l, kuid need võivad märkimisväärselt suurendada CO₂ tekkimist kontrollkatsetes (26);
 - ei sisalda rohkem kui 10 % uuritava kemikaaliga lisatavast orgaanilise süsiniku lähtekontsentratsioonist;
 - võimaldab lisada tavaliselt 1–10 ml inokulumi 1 liitri katselahuse kohta.

Aktiivmuda

27. Aktiivmuda kogutakse värskest reoveepuhasti või peamiselt olmereovett töötleva laborimõõdus seadme aeratsiooninõust. Vajaduse korral tuleks suured osakesed sõelumisega kõrvaldada (sõelaava näiteks 1 mm²) ja muda tuleks hoida kuni kasutamiseni aeroobsena.
28. Alternatiivselt võib aktiivmuda pärast suurte osakeste kõrvaldamist lasta settida või tsentrifuugida (näiteks 1 100 × g 10 minuti vältel). Supernatant valatakse ära. Muda võib pesta mineraalse lahusega. Suspendeerige kontsenteeritud hõljuvaine mineraalses toitekeskkonnas, et saada kontsentratsioon 3–5 g tahkeid osakesi liitri kohta. Seejärel aereerige, kuni on vaja.
29. Muda tuleks võtta tavapärasest töökorrast puhastist. Suure koormusega puhastist pärinevat või inhibiitoreid sisaldavat muda tuleks pesta. Pärast põhjalikku segamist resuspendeeritud muda setitatakse või tsentrifuugitakse, kõrvaldatakse supernatant ja suspendeeritakse muda uuesti järgmises koguses mineraalses toitekeskkonnas. Seda korratakse, kuni muda peaks olema vaba liigest substraadist või inhibiitorist.
30. Täielikult resuspendeeritud või töötlemata mudast võetakse vahetult enne kasutamist proov hõljuvaine kuivkaalu määramiseks.
31. Veel üks võimalus on aktiivmuda homogeniseerida (3–5 g hõljuvaint / l). Muda töödeldakse Waringi segistis keskmisel kiirusel 2 min. Segatud muda setitatakse 30 minutit või vajaduse korral kauem ja dekanteeritakse vedelik, mida kasutatakse inokulumina kontsentratsioonil u 10 mg/l mineraalse kasvukeskkonna kohta.

▼ **M4**

32. CO₂ teket kontrollkatsetes on võimalik vähendada veel sellega, et muda aereeritakse järgmise päevani õhuga, mis ei sisalda CO₂. Sellises katses kasutatakse inokulumi kontsentratsiooni 4 mg aktiivmuda tahkeid osakesi 1 liitri kohta (13).

Reovee teisene väljavool

33. Inokulumi võib saada ka valdavalt olmereovett töötleva puhasti või laborimöödus seadme sekundaarsest väljavoolust. Säilitage proovi aeroobsetes tingimustes ja kasutage seda võtmise päeval või laske sellel vajaduse korral kohaneda. Väljavool tuleks filtrida läbi jämefiltrit, et eemaldada suured osakesed, ja seejärel mõõta pH.
34. Väljavoolu anorgaanilise süsiniku sisalduse vähendamiseks puhutakse filtraadist läbi CO₂-vaba õhku (punkti 15 alapunkt e) ühe tunni vältel, hoides ortofosforhappe abil pH väärtust 6,5 (punkt 20). Algne pH taastatakse naatriumhüdroksiidiga (punkt 21) ja pärast ligikaudu üks tund kestnud settimist võetakse inokulatsiooniks vajalik kogus supernatanti. Sellise barboteerimisega vähendatakse inokulumis anorgaanilise süsiniku sisaldust. Kui inokulamina kasutati näiteks filtritid barboteeritud väljavoolu maksimaalset soovituslikku kogust (100 ml/l), jäi kontrollnõudes olev anorgaanilise süsiniku kogus vahemikku 0,4 kuni 1,3 mg/l (14), mis moodustas 2–6,5 % uuritava kemikaaliga lisatud süsinikusisaldusest 20 mg C/l juures ja 4–13 % 10 mg C/l juures.

Pinnavesi

35. Proov võetakse asjakohasest pinnaveest. Seda tuleks hoida aeroobsetes tingimustes ja kasutada võtmise päeval. Proov peaks vajaduse korral olema kontsentreeritud filtrimise või tsentrifuugimisega. Igas katsenõus kasutatud inokulumi maht peaks vastama punktis 26 esitatud kriteeriumidele.

Muld

36. Maapinnast kuni 20 cm sügavuselt võetakse asjakohane mullaproov. Kivid, taimejäänused ja selgrootud tuleks mullaproovist eemaldada enne selle sõelumist läbi 2 mm avaga sõela (kui proov on kohe sõelumiseks liiga märg, kuivatage seda sõelumise võimaldamiseks osaliselt õhu käes). Proovi tuleks hoida aeroobsetes tingimustes ja kasutada võtmise päeval (kui proovi transportitakse lõdvalt kinniseotud mustas polüetüleenkotis, siis võib seda kotis säilitada 2–4 °C juures kuni ühe kuu vältel).

Inokulumi kohanemine

37. Inokulumil võib lasta kohaneda katsetingimustega, kuid mitte uuritava kemikaaliga. Kohanemine võib vähendada CO₂ teket kontrollkatsetes. Kohanemine hõlmab aktiivmuda katsetemperatuuril aereerimist niiske CO₂-vaba õhuga 5–7 päeva jooksul pärast muda lahjendamist katse kasvukeskkonnas kontsentratsioonini 30 mg/l.

KATSE KÄIK*Pudelite arv*

38. Katse jaoks vajalike pudelite arv (punkti 15 alapunkt a) oleneb analüüside sagedusest ja katse kestusest.
39. On soovitatav analüüsida piisavate ajavahemike järel kolme pudelit, et oleks võimalik määrata kindlaks kümnepäevane ajavahemik. Katse lõpus analüüsitakse vähemalt viit katsepudelit (punkti 15 alapunkt a) komplektidest a, b ja c (vt punkt 42), et saaks arvutada biolagunemise keskmise protsendilise näitaja 95 % usaldusvahemikku.

▼ **M4***Inokuleeritud kasvukeskkond*

40. Inokulumi kasutatakse kontsentratsioonil 4 mg aktiivmuda tahkeid kuivi osakesi ühe liitri kohta. Vahetult enne kasutamist valmistage piisavalt inokuleeritud kasvukeskkond, lisades näiteks 2 ml töödeldud aktiivmuda (punktid 27–32) kontsentratsiooniga 2 000 mg/l 1 liitrile mineraalsooli sisaldavale kasvukeskkonnale (punkt 19). Reovee sekundaarse väljavoolu kasutamise korral lisage kuni 100 ml väljavoolu (punkt 33) 900 ml mineraalsooli sisaldavale kasvukeskkonnale (punkt 19) ja lahjendage kasvukeskkonnaga 1 liitrini.

Pudelite ettevalmistamine

41. Inokuleeritud kasvukeskkonna alikvoodid sisestatakse paralleelproovide pudelitesse, et saada vabaruumi ja vedeliku suhe 1 : 2 (näiteks 160 ml mahuga pudelitesse lisage 107 ml). Võib kasutada ka muud suhtarvu, kuid seejuures tuleb arvesse võtta punktis 11 esitatud hoiatust. Ükskõik kumba tüüpi inokulumi kasutamise puhul tuleb jälgida, et inokuleeritud kasvukeskkond oleks piisavalt segatud, et selle saaks ühtlaselt jaotada katsepudelitesse.
42. Valmistatakse ette järgmise sisuga pudelite komplektid (punkti 15 alapunkt a):
- a) uuritavat kemikaali sisaldavad katsenõud (tähis F_T);
 - b) ainult katse kasvukeskkonda ja inokulumi sisaldavad kontrollnõud (tähis F_B); neisse tuleb lisada ka kõik kemikaalid, lahustid, ained või klaaskiudfiltrid, mida kasutatakse uuritava kemikaali lisamiseks katsenõudesse;
 - c) nõud võrdluskemikaaliga (tähis F_C) katse õige läbiviimise kontrollimiseks;
 - d) vajaduse korral uuritava kemikaali võimaliku inhibeeriva mõju kontrollimise nõud (tähis F_I), mis sisaldavad nii uuritavat kemikaali kui ka võrdluskemikaali samal kontsentratsioonil kui vastavalt pudelid F_T ja F_C (punkt 24);
 - e) nõud (tähis F_S) nagu punktis a võimaliku abiootilise lagunemise kontrollimiseks, millesse lisatakse 50 mg/l $HgCl_2$ või mis steriliseeritakse muul viisil (näiteks autoklaavimine).
43. Vees lahustuvad uuritavad kemikaalid ja võrdluskemikaalid lisatakse põhilahustena vees (punktid 22, 23 ja 24), et saada kontsentratsioon 10–20 mg C/l.
44. Lahustumatu uuritav kemikaal ja lahustumatu võrdluskemikaal lisatakse pudelitesse sobival viisil (vt punkti 22 alapunktid a–e), olenevalt uuritava kemikaali laadist ja lisamise meetodist kas enne või pärast inokuleeritud kasvukeskkonna lisamist. Kui kasutatakse punkti 22 alapunktides a–e nimetatud meetodit, tuleks kontrollpudeleid F_B (punkti 42 alapunkt b) töödelda samal viisil, kuid ilma uuritavat kemikaali või võrdluskemikaali lisamata.
45. Lenduv uuritav kemikaal tuleks mikrosüstla abil sisestada suletud pudelisse (punkt 47). Doos arvutatakse sisestatava koguse ja uuritava kemikaali tiheduse alusel.
46. Vajaduse korral tuleks nõudesse lisada vett, et kõigis nõudes oleks ühesugune vedelikukogus. Tuleb tagada, et vabaruumi ja vedeliku suhe (enamasti 1 : 2) ning uuritava kemikaali kontsentratsioon on sellised, et vabaruumis on piisavalt hapnikku täieliku biolagunemise võimaldamiseks.

▼ **M4**

47. Kõik pudelid suletakse seejärel näiteks butüülkummist vahekorgi ja alumiiniumkapsliga. Lenduv uuritav kemikaal tuleks lisada selles etapis (punkt 45). Kui katselahuses jälgitakse lahustunud orgaanilise süsiniku kontsentratsiooni vähenemist ning kui anorgaanilise süsiniku algkontsentratsiooni (steriilne kontrollkatse, punkti 42 alapunkt e) või muid näitajaid määratakse aja nullpunktis, siis eemaldatakse asjaomane proov katsenõust. Katsenõu ja selle sisu tuleb seejärel kõrvaldada.
48. Suletud pudelid asetatakse pöördloksutile (punkti 15 alapunkt d), mille loksutuskiirus on piisav pudeli sisu hästi segatuna ja suspensioonis hoidmiseks (näiteks 150 kuni 200 pööret minutis), ja inkubeeritakse pimedas temperatuuril 20 ± 1 °C.

Proovide võtmine

49. Proovide võtmise kava sõltub ooteperiодist ja uuritava kemikaali biolagunemise kineetilise kiirusest. Pudelid analüüsitakse proovivõtu päeval; proove võetakse vähemalt iga nädal või sagedamini (näiteks kaks korda nädalas), kui on vaja koostada täielik lagunemiskõver. Loksutist võetakse nõutav arv F_T , F_B ja F_C paralleelproovide pudeleid ning, kui neid kasutatakse, siis ka F_1 ja F_S pudeleid (vt punkt 42). Katse kestus on tavaliselt 28 päeva. Kui biolagunemise kõver näitab, et enne 28 päeva möödumist on jõutud platooni, siis võib katse lõpetada enne 28. päeva. Võtke proovid viiest pudelist, mis on hoitud 28. päeva analüüsi jaoks, ja kasutage tulemusi, et arvutada biolagunemise protsendi usalduspiirid või variatsioonikordaja. Inhibeerimise ja abiootilise lagunemise kontrollkatsete pudeleid ei ole vaja võtta proovideks sama sagedasti kui teisi pudeleid; piisab proovi võtmisest 1. ja 28. päeval.

Anorgaanilise süsiniku analüüs

50. CO₂ tekkimine pudelites inkubeerimise ajal tehakse kindlaks anorgaanilise süsiniku kontsentratsiooni suurenemise mõõtmisega. Katse jooksul tekkinud anorgaanilise süsiniku koguse mõõtmiseks on kaks soovitatud meetodit, mida on kirjeldatud allpool. Kuna meetodid võivad anda veidi erineva tulemuse, tuleks katse vältel neist kasutada ainult ühte.
51. Meetodit a soovitatakse juhul, kui kasvukeskkond võib tõenäoliselt sisaldada näiteks klaasfilterpaberi ja/või lahustumatu uuritava kemikaali jääke. Kui süsiniku analüsaatorit ei ole, siis võib selle analüüsi teha gaaskromatograafia. Vabaruumi gaasi analüüsimise käigus on tähtis, et pudelid oleksid katsetemperatuuril või sellele lähedal. Meetod b võib olla lihtsam laborile, kes kasutab anorgaanilise süsiniku mõõtmiseks süsiniku analüsaatorit. On tähtis, et CO₂ karbonaadiks muundamiseks kasutatav naatriumhüdroksiidi lahus (punkt 21) oleks kas värskest valmistatud või selle anorgaanilise süsiniku sisaldus oleks teada, et seda saaks katsetulemuste arvutamisel arvesse võtta (vt punkti 66 alapunkt b.)

Meetod a: hapestamine pH-ni < 3

52. Enne iga analüüside partiid kalibritakse anorgaanilise süsiniku analüsaator asjakohase anorgaanilise süsiniku standardi abil (näiteks 1 massiprotsent CO₂ N₂-s). Läbi iga proovivõtuks kasutatava pudeli vahekorgi süstitakse kontsenteeritud ortofosforhapet (punkt 20), et viia kasvukeskkonna pH väärtusele < 3 (näiteks 107 ml katse kasvukeskkonnale lisatakse 1 ml). Pudelid pannakse tagasi loksutile. Pärast ühetunnist loksutamist katsetemperatuuril võetakse pudelid loksutilt, iga pudeli vabaruumist võetakse gaasi alikvoot (näiteks 1 ml) ja süstitakse anorgaanilise süsiniku analüsaatorisse. Anorgaanilise süsiniku mõõdetud kontsentratsioon väljendatakse ühikutes mg C/l.

▼M4

53. Selle meetodi põhimõte seisneb asjaolus, et pärast hapestamist tasemele pH < 3 ja tasakaalustamist 20 °C juures on katsepudelites CO₂ vedela ja gaasifaasi vahel jaotumise tasakaalukonstant 1,0, kui seda mõõdetakse kontsentratsioonina (13). Seda tuleks katseüsteemi puhul vähemalt üks kord järgmiselt tõendada.

Valmistage ette pudelid, mis sisaldavad 5 ja 10 mg/l anorgaanilist süsinikku, kasutades veevaba naatriumkarbonaadi (Na₂CO₃) lahust CO₂-vabas vees, mis on valmistatud kontsentreeritud ortofosforhappe abil (punkt 20) vee pH viimisega väärtuseni 6,5, lahuse barboteerimisega järgmise päevani CO₂-vaba õhuga ja pH viimisega neutraalseks leelise abil. Kontrollige, et vabaruumi mahu ja vedelikukoguse suhe oleks sama kui katsete puhul (näiteks 1 : 2). Hapestage ja tasakaalustage punktis 52 kirjeldatud viisil ning mõõtkte anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon nii vabaruumis kui ka vedelfaasis. Kontrollige, et need kaks kontsentratsiooni langeksid katsevea piires kokku. Kui need kokku ei lange, peaks katse tegija meetodid üle vaatama. Seda anorgaanilise süsiniku vedela ja gaasifaasi vahel jaotumise kontrolli ei ole vaja teha iga katse puhul; seda võib eeldatavasti teha kalibreerimise ajal.

54. Kui mõõdetakse lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist (ainult vees lahustuvad uuritavad kemikaalid), tuleks proovid võtta eraldi (hapestamata) pudelite vedelfaasist, filtrida membraanfiltriga ja süstida lahustunud orgaanilise süsiniku analüsaatorisse. Neid pudeleid võib vajaduse korral kasutada muudeks analüüsideks, et mõõta esmast biolagunemist.

Meetod b: CO₂ muundamine karbonaadiks

55. Enne iga analüüside partiid kalibritakse anorgaanilise süsiniku analüsaator asjakohase standardi abil, näiteks naatriumvesinikkarbonaadi (NaHCO₃) lahusega CO₂-vabas vees (vt punkt 53) anorgaanilise süsiniku vahemikus 0–20 mg/l. Läbi iga proovivõtuks kasutatava pudeli vahekorgi süstitakse naatriumhüdroksiidi lahust (7M, punkt 21) (näiteks 107 ml kasvukeskkonna kohta lisatakse 1 ml) ja pudeleid loksutatakse tund aega katsetemperatuuril. Kõigisse konkreetsel päeval kasutatavatesse pudelitesse süstitakse sama NaOH lahust; katse eri proovivõtukordadel aga ei ole vaja kasutada sama lahust. Kui kõigil proovivõtukordadel on vaja mõõta anorgaanilise süsiniku absoluutsed väärtused kontrollkatsetes, tuleb iga kasutamise ajal määrata NaOH lahuses anorgaaniline süsinik. Pudelid võetakse loksutilt ja neil lastakse settida. Iga nõu vedelfaasist võetakse süstlaga vajalik kogus (näiteks 50 – 1 000 µl). Proov süstitakse anorgaanilise süsiniku analüsaatorisse ja registreeritakse anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon. Kasutatav analüsaator peab olema kohandatud selle meetodiga saadavate leeliseliste proovide mõõtmiseks.
56. Selle meetodi põhimõte seisneb selles, et pärast leelise lisamist ja loksutamist on anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon vabaruumis ebaoluline. Katseüsteemis tuleks seda vähemalt üks kord kontrollida anorgaanilise süsiniku standardiga, leelise lisamise, tasakaalustamise ja anorgaanilise süsiniku kontsentratsiooni mõõtmisega nii vabaruumis kui ka vedelfaasis (vt punkt 53). Kontsentratsioon vabaruumis peaks olema nullilähedane. Kõnealust CO₂ peaaegu täieliku neeldumise kontrolli ei ole vaja teha iga katse puhul.
57. Kui mõõdetakse lahustunud orgaanilise süsiniku kõrvaldamist (ainult vees lahustuvad uuritavad kemikaalid), tuleks eraldi pudelite vedelfaasist (leelist lisamata) võtta proovid, filtrida membraanfiltriga ja süstida lahustunud orgaanilise süsiniku analüsaatorisse. Neid pudeleid võib vajaduse korral kasutada veel muudeks analüüsideks, et mõõta esmast biolagunemist.

▼ **M4****ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste arvutamine**

58. Kui eeldada uuritava kemikaali 100 % mineraliseerumist CO₂-ni, on kontrollnõus tekkivale CO₂-le lisandunud maksimaalne teoreetiliselt võimalik anorgaanilise süsiniku sisaldus (ThC) võrdne igasse katsepudelis katse alguses lisatud orgaanilise süsiniku kogusisaldusega (TOC), s.o:

$$\text{ThC} = \text{TOC}$$

Anorgaanilise süsiniku kogumass TIC (mg) igas pudelis on:

$$\begin{aligned} \text{TIC} &= (\text{mg C vedelikus} + \text{mg C vabaruumis}) && \text{võrrand 1,} \\ &= (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \end{aligned}$$

kus:

V_L = vedeliku kogus pudelis (liitrites);

C_L = anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon vedelikus (mg/l süsinikuna);

V_H = kogus vabaruumis (liitrites);

C_H = anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon vabaruumis (mg/l süsinikuna).

Anorgaanilise süsiniku kogumassi (TIC) arvutamist käesolevas katses anorgaanilise süsiniku mõõtmiseks kasutatud kahe analüüsimeetodi korral on kirjeldatud allpool punktides 60 ja 61. Biolagunemise protsent (% D) leitakse kummalgi juhul järgmiselt:

$$\%D = \frac{(\text{TIC}_t - \text{TIC}_b)}{\text{TOC}} \times 100 \quad \text{võrrand 2,}$$

kus:

TIC_t = anorgaanilise süsiniku kogumass (mg) katsepudelis ajal t;

TIC_b = keskmine anorgaanilise süsiniku kogumass (mg) kontrollpudelis ajal t;

TOC = katsenõusse algselt lisatud anorgaanilise süsiniku kogumass (mg).

Biolagunemise protsent % D arvutatakse katse (F_T), võrdluskatse (F_C) ja (kui seda kasutatakse) inhibeerimise seire kontrollkatse (F_I) pudelites kuni iga proovivõtueajani tekkinud anorgaanilise süsiniku kogumassi alusel.

59. Kui katse vältel suureneb oluliselt anorgaanilise süsiniku kogumass steriilsetes kontrollnõudes (F_S), siis võib järeldada, et uuritav kemikaal laguneb abiootiliselt, ja seda tuleb võrrandis 2 D arvutamisel arvesse võtta.

Hapestamine pH väärtusele < 3

60. Kuna hapestamisel pH väärtusele < 3 ja tasakaalustamisel muutuvad anorgaanilise süsiniku kogumassi kontsentratsioonid vedelfaasis ja gaasifaasis võrdseks, siis on vaja mõõta ainult gaasifaasi anorgaanilise süsiniku kontsentratsioon. Seega saab võrrandi 1 alusel tuletada $\text{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, kus V_B on seerumipudeli maht.

CO₂ muundamine karbonaadiks

61. Selle meetodi puhul tehakse arvutused võrrandi 1 järgi, aga ebaolulist anorgaanilise süsiniku kogust gaasifaasis ei võeta arvesse, s.o $V_H \times C_H = 0$, ja $\text{TIC} = V_L \times C_L$.

▼ **M4****Tulemuste väljendamine**

62. Biolagunemise kõvera saamiseks kantakse graafikule biolagunemise protsent D sõltuvalt inkubatsiooniajast ning võimaluse korral näidatakse ootefaas, biolagunemise faas, kümnepäevane ajavahemik ja platoofaas (s.o faas, kus on jõutud maksimaalse lagunemiseni ja biolagunemise kõver muutub horisontaalseks). Kui F_T paralleelkatsetes saadakse võrreldavad väärtused (erinevus $< 20\%$), koostatakse keskmistatud kõver (vt 2. liite joonis 1); kui tulemused ei ole võrreldavad, koostatakse kõver iga nõu kohta. Määratakse platoofaasi biolagunemise protsendi keskvärtus või hinnatakse suurim väärtus (näiteks kui kõver hakkab platoofaasis langema); viimati nimetatud juhul on tähtis kontrollida, et väärtus ei oleks võõrväärtus. Katseprotokollis tuleb see biolagunemise maksimaalne tase märkida kui „uuritava kemikaali biolagunemise määr”. Kui katsenõude arv ei ole piisav platoofaasi kindlakstegemiseks, kasutatakse keskvärtuse arvutamiseks katse viimasel päeval mõõdetud andmeid. Viimane nimetatud väärtus, viie paralleelkatse keskmine, näitab biolagunemise protsendi määramise täpsust. Samuti tuleb registreerida kümnepäevase ajavahemiku lõpus saadud näitaja.
63. Samal viisil koostatakse võrdluskemikaali F_C biolagunemise kõver ning (kui seda kasutatakse) abiootilise kõrvaldamise kontrolli F_S ja inhibeerimise kontrolli F_I kõver.
64. Uuritava kemikaalita kontrollkatsetes (F_B) oleva anorgaanilise süsiniku kogumass registreeritakse; samuti toimitakse F_S (abiootiline kontroll) nõude puhul, kui katses kasutati kõnealuseid kontrollnõusid.
65. F_I nõude puhul arvutatakse D teoreetiliselt võimaliku anorgaanilise süsiniku tekkimise alusel, lähtudes ainult segus oleva võrdluskemikaali sisaldusest. Kui 28. päeval $[(D_{FC}^{(1)} - D_{FI}^{(2)}) / D_{FC}] \times 100 > 25\%$, siis võib eeldada, et uuritav kemikaal inhibeeris inokulumi tegevust, ja see võib seletada katse tingimustes saadud D_{FT} madalat väärtust. Sel juhul võib katset korrata, kasutades väiksemat uuritava kemikaali kontsentratsiooni ning eelistatavalt vähendades lahustunud anorgaanilise süsiniku sisaldust inokulumis ja uuritava kemikaalita kontrollnõudes tekkinud anorgaanilise süsiniku kogumassi, kuna vastasel juhul vähendab väiksem kontsentratsioon meetodi täpsust. Alternatiivselt võib kasutada muud inokulumi. Kui kolvis F_S (abiootiline) täheldatakse anorgaanilise süsiniku kogumassi olulist suurenemist ($> 10\%$), siis võis esineda abiootilist lagunemist.

Tulemuste kehtivus

66. Katset peetakse kehtivaks, kui
- võrdluskemikaali sisaldavates nõudes F_C on keskmine lagunemise protsent $> 60\%$ inkubatsiooni 14. päevaks ja
 - kontrollnõudes F_B on anorgaanilise süsiniku kogumassi keskmine kogus katse lõpus > 3 mg C/l.

Kui need piirmäärad ei ole täidetud, tuleks katset korrata muust allikast pärit inokulumiga ja/või kasutatud meetodid tuleks läbi vaadata. Näiteks kui probleem on rohke anorgaanilise süsiniku tekkimine kontrollnõudes, tuleks kasutada punktides 27–32 kirjeldatud meetodit.

⁽¹⁾ Lagunemise protsent F_C nõudes, mis sisaldavad võrdlusainet.

⁽²⁾ Lagunemise protsent F_I nõudes.

▼ **M4**

67. Kui uuritava kemikaali lagundamisel ei saavuta 60 % teoreetiliselt maksimaalsest anorgaanilise süsiniku sisaldusest ja inhibeerivat mõju ei täheldatud (punkt 65), võib katset korrata inokulumi suurema kontsentratsiooniga (kuni 30 mg/l aktiivmuda ja 100 ml väljavoolu / l) või muudest allikatest saadud inokulumiga, eelkõige siis, kui lagunemine jäi vahemikku 20–60 %.

Tulemuste tõlgendamine

68. Selles katses näitab biolagunemine > 60 % teoreetiliselt maksimaalsest anorgaanilise süsiniku tasemest kümnepäevase ajavahemiku jooksul, et uuritav kemikaal on aeroobsetes tingimustes kiirelt biolagundatav.
69. Kui nõutud kriteerium – 60 % teoreetiliselt maksimaalsest anorgaanilise süsiniku kogusest – ei ole täidetud, määratakse pudelites oleva kasvukeskkonna pH (ilma hapestamata või leelistamata); väärtus alla 6,5 võib viidata nitrifikatsiooni toimumisele. Sel juhul tuleb katset korrata puhverlahuse suurema kontsentratsiooniga.

Katseprotokoll

70. Koostatakse tabel, milles on % D väärtused iga katse (F_T), võrdluse (F_C) ja (kui seda kasutati) inhibeerimise kontrollnõu (F_I) iga proovivõtu päeva kohta. Kui paralleelproovide pudelite kohta saadakse võrreldavad tulemused, siis koostatakse keskmise % D ajast sõltuvuse graafik. Registreeritakse anorgaanilise süsiniku kogumass kontrollnõudes (F_B) ja lahustunud orgaaniline süsinik ja/või muud näitajad steriilsetes kontrollnõudes (F_S) ning nende kõrvaldamise protsent.
71. Määratakse % D keskvärtus platoofaasis või suurim väärtus, kui biolagunemise kõver platoofaasis langeb, ning esitatakse see uuritava kemikaali lagunemise määranäht. Tähtis on tagada, et viimati nimetatud juhul ei oleks suurim näitaja võõrväärtus.
72. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

Uuritav kemikaal:

- tavanimetus, keemiline nimetus, CASi number, struktuurivalem ja asjakohased füüsikalised-keemilised omadused;
- uuritava kemikaali puhtus (lisandid).

Katsetingimused:

- viide käesolevale katsemeetodile;
- kasutatud katsesüsteemi kirjeldus (näiteks nõu maht, vabaruumi ja vedeliku suhe, segamise meetod jne);
- uuritava kemikaali ja võrdluskemikaali lisamine katsesüsteemi: kasutatud kontsentratsioonid ja igasse katsepudelisse lisatud süsiniku kogus ning lahustite kasutamine;
- andmed kasutatud inokulumi kohta, iga eeltöötlemine ja kohandamine;
- inkubatsioonitemperatuur;
- anorgaanilise süsiniku analüüsi põhimõtte valideerimine;
- kasutatud anorgaanilise süsiniku analüsaatori (ja muude kasutatud analüüsimeetodite) peamised omadused;
- paralleelproovide arv.

Tulemused:

- mõõdetud biolagundatavuse andmed ja arvutatud väärtused tabeli kujul;

▼ **M4**

- katse- ja võrdluskemikaali lagunemise protsendi sõltuvus ajast graafikuna, ootefaas, lagunemisfaas, kümnapäevane ajavahemik ja tõus;
- kõrvaldamise protsent platoofaasis, katse lõpus ja pärast kümnapäevast ajavahemikku;
- iga katsetulemuste arvestamata jätmise põhjendus;
- kõik muud andmed, mis on kasutatud katsemeetodi puhul asjakohased;
- tulemuste arutelu.

KIRJANDUS

- 1) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine – CO₂ eraldumise katse (meetod C.4-C)“.
- 2) Sturm RN (1973). Biodegradability of Nonionic surfactants: screening test for predicting rate and ultimate biodegradation. *J.A.,Oil Chem Soc.* 50: 159–167.
- 3) Larson RJ (1979). Estimation of biodegradation potential of xenobiotic organic chemicals. *Appl Env. Microbiol.* 38: 1153–1161.
- 4) Larson RJ, Hansmann MA and Bookland EA (1996). Carbon dioxide recovery in ready biodegradability tests: mass transfer and kinetic constants, *Chemosphere* 33: 1195–1210.
- 5) ISO 9439 (1990; revised 1999). Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium - Carbon dioxide evolution Test (Sturm).
- 6) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3110 Carbon dioxide evolution test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- 7) US EPA (1996). Fate, Transport and Transformation Test Guideline. 835. 3100. Aerobic aquatic biodegradation. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substances Washington, DC.
- 8) Gledhill WE (1975). Screening test for assessment of biodegradability: Linear alkyl benzene sulfonate. *Appl Microbiol.* 30: 922–929.
- 9) Weytjens D, Van Ginneken I and Painter HA (1994). The recovery of carbon dioxide in the Sturm test for ready biodegradability. *Chemosphere* 28: 801–812.
- 10) Ennis DM and Kramer A (1975). A rapid microtechnique for testing biodegradability of nylons and polyamides. *J. Food Sci.* 40: 181–185.
- 11) Ennis DM, Kramer A, Jameson CW, Mazzoccki PH and Bailey PH (1978). *Appl. Env. Microbiol.* 35: 51–53.
- 12) Boatman RJ, Cunningham SL and Ziegler DA (1986). A method for measuring the biodegradation of organic chemicals, *Env. Toxicol. Chem.* 5: 233–243.
- 13) Struijs J and Stoltenkamp J (1990). Head space determination of evolved carbon dioxide in a biodegradability screening test. *Ecotox. Env. Safety* 19: 204–211.
- 14) Birch RR and Fletcher RJ (1991). The application of dissolved inorganic carbon measurements to the study of aerobic biodegradability. *Chemosphere* 23: 507–524.
- 15) Birch RR, Biver C, Campagna R, Gledhill WE, Pagga U, Steber J, Reust H, and Bontinck WJ (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. *Chemosphere* 19: 1527–1550.

▼ M4

- 16) ISO 14593, (1999) Water Quality - Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in an aerobic medium-method by analysis of inorganic carbon in sealed vessels (CO₂ headspace test).
- 17) Battersby NS (1997). The ISO headspace CO₂ biodegradation test, *Chemosphere* 34: 1813–1822.
- 18) US EPA (1996). Fate, Transport and Transportation. 835.3120. Sealed vessel carbon dioxide production test. Office, Prevention Pesticides and Toxic Substance, Washington, DC.
- 19) Battersby NS, Ciccognani D, Evans MR, King D, Painter HA, Peterson DR and Starkey M (1999). An „inherent” biodegradability test for oil products: description and results of an international ring test. *Chemosphere* 38: 3219–3235.
- 20) Käesoleva lisa peatükk C.4 „Kohese biolagunduvuse määramine”.
- 21) OECD (1988). OECD Ring-test of methods for determining ready biodegradability: Chairman’s report (M. Hashimoto; MITI) and final report (M. Kitano and M. Takatsuki; CITI). Paris.
- 22) Käesoleva lisa peatükk C.11 „Aktiivmuda respiratsiooni pärssimise katse”.
- 23) Struijs J, Stoltenkamp-Wouterse MJ and Dekkers ALM (1995). A rationale for the appropriate amount of inoculum in ready biodegradability tests. *Biodegradation* 6: 319–327.
- 24) EU (1999). Ring-test of the ISO Headspace CO₂ method: application to surfactants: Surfactant Ring Test-1, Report EU4697, Water Research Centre, May 1999, Medmenham, SL7 2HD, UK.
- 25) ISO 10634 (1996) 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.

▼ **M4**

1. liide

LÜHENDID JA MÕISTED

IC – anorgaaniline süsinik.

ThCO₂ – teoreetiline süsinikdioksiid (mg) on arvutuslik süsinikdioksiidi kogus, mis tekib uuritava kemikaali teadaolevast või mõõdetud süsinikusisaldusest uuritava kemikaali täielikul mineraliseerumisel; seda väljendatakse ka uuritava kemikaali mg kohta tekkinud süsinikdioksiidi mg-dena.

DOC – lahustunud orgaaniline süsinik (*dissolved organic carbon*) on lahuses olev orgaaniline süsinik või süsinik, mis läbib 0,45-mikromeetrise filtri või jääb supernatanti 15-minutilise tsentrifuugimisel ligikaudu 4 000 g (ligikaudu 40 000 m/s²) juures.

DIC – lahustunud anorgaaniline süsinik (*dissolved inorganic carbon*).

ThIC – teoreetiline anorgaanilise süsiniku sisaldus (*theoretical inorganic carbon*).

TIC – anorgaanilise süsiniku kogusisaldus (*total inorganic carbon*).

Kiiresti biolagundatav – hinnanguline klassifikatsioon sellise kemikaali kohta, mis on läbinud konkreetse kindlaks määratud lõpliku biolagunemise sõelumiskatsed; kõnealused katsed on nii ranged, et kõnealust kemikaali võib pidada kiiresti ja täielikult biolagundatavaks veekeskkonnas aeroobsetes tingimustes.

Kümnepäevane ajavahemik – 10 % biolagunemise saavutamisele vahetult järgnevad kümme päeva.

Iseeneslik biolagundatavus – klassifikatsioon kemikaalide kohta, mille (esmasest või lõpliku) biolagunemise kohta on mis tahes biolagundatavuse katses saadud kindlad tõendid.

Täielik aeroobne biolagunemine – saavutatud lagunemise määr, mille korral mikroorganismid on uuritava kemikaali täielikult ära tarvitanud ja muutnud selle süsinikdioksiidiks, veeks, mineraalooladeks ja uuteks mikroobirakkudeks (biomassiks).

Mineraliseerumine – mineraliseerumine on orgaanilise kemikaali täielik lagunemine CO₂-ks ja H₂O-ks aeroobsetes tingimustes ning CH₄-ks, CO₂-ks ja H₂O-ks anaeroobsetes tingimustes.

Ootefaas – aeg katse algusest kuni ajani, millal lagundava toimega mikroorganismid on aklimatiseerunud ja/või kohanenud ja uuritava kemikaali või orgaanilise aine biolagunemine on jõudnud avastatava tasemeni (näiteks 10 % maksimaalsest teoreetilisest biolagunemisest või vähem, olenevalt mõõtemetodi täpsusest).

Lagunemisfaas – aeg ootefaasi lõpust ajani, mil on saavutatud 90 % maksimaalsest lagunemisest.

Platoofaas – platoofaas on faas, kus on jõutud maksimaalse lagunemiseni ja biolagunemise kõver muutub horisontaalseks.

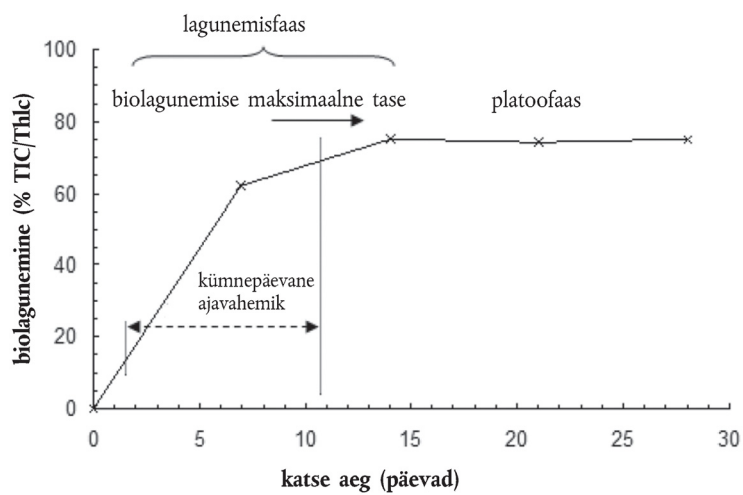
Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M4**

2. liide

Biolagunemise kõvera näide

Joonis 1

1-oktaanooli biolagunemine CO₂ vabaruumi katses

Mõisted

biolagunemine

lagunemisfaas

biolagunemise maksimaalne tase

platoofaas

kümnepäevane ajavahemik

katse aeg (päevad)

▼M4

C.30. BIOAKUMULATSIOON MULLA VÄHEHARJASUSSIDES
SISSEJUHATUS

1. Käesolev katsemeetod on samaväärne OECD katsejuhendiga nr 317 (2010). Keskkonnale avalduva mõjuga seotud katsemeetoditest avaldati „Biokontsentratsioon: kaladega läbivoolukatse” (käesoleva lisa peatükk C.13 (49)) ja „Bioakumulatsioon setetes elavates põhjaloomadest väheharjasussides” (53) vastavalt 1996. aastal ja 2008. aastal. Vesikeskkonna bioakumulatsiooni andmete ekstrapoleerimine sellistele mullaorganismidele nagu vihmaussid on keeruline, kui üldse võimalik. Uuritava kemikaali lipofiilsusel põhinevaid mudelarvutusi, vt näiteks kirjanduse loetelust 14 ja 37, kasutatakse praegu mullas toimuva kemikaalide bioakumulatsiooni hindamiseks, näiteks ELi tehnilises juhenddokumendis (19). Keskkonnaosa-põhise katsemeetodi vajadusega on juba tegeldud, vt näiteks 55. Selline meetod on eelkõige tähtis teisese mürgisuse hindamiseks mullas elavate loomade toiduahelates (4). Mitmes riiklikus katsemeetodis käsitletakse bioakumulatsiooni muudes organismides kui kalad, vt näiteks kirjanduse loetelust 2 ja 72. USA Materjalide Katsetamise Ühing (3) on välja töötanud meetodi bioakumulatsiooni mõõtmiseks saastunud mullas elavates vihmaussides (*Eisenia fetida*, Savigny) ja valgeliimuklastes. Rahvusvaheliselt tunnustatud meetod bioakumulatsiooni määramiseks rikastatud mullas parandab kemikaalide riskihindamist maapealsetes ökosüsteemides (vt näiteks 25, 29).
2. Mulda söövad selgrootud puutuvad kokku mullas olevate kemikaalidega. Nende loomade hulgas on mulla väheharjasussidel mulla struktuuri ja toime säilitamisel tähtis osa (15, 20). Mulla väheharjasussid elavad mullas ja osaliselt maapinnal (eelkõige metsavarise kihis); nad on biomassi mõistes sageli kõige rikkalikum liik (54). Mulla bioturbatsiooni teel ja olles toiduks teistele loomadele võivad need loomad suurel määral mõjutada kemikaalide biosaadavust muudele organismidele, nagu selgrootud röövloomad (näiteks röövlestad ja -põrnikad (näiteks 64) või selgroogsed röövloomad (näiteks rebased ja kajakad) (18, 62). Mõnd mulla väheharjasusside liiki, keda praegu ökotoksikoloogilistes katsetes kasutatakse, on kirjeldatud 5. liites.
3. USA Materjalide Katsetamise Ühingu standardjuhend mulla mürgisuse või bioakumulatsiooni laborikatsete tegemise kohta *Lumbricidae* sugukonda kuuluva vihmaussiga *Eisenia fetida* ja *Enchytraeidae* sugukonda kuuluva valgeliimukaga *Enchytraeus albidus* (3) annab palju üliolulisi ja kasulikke andmeid käesoleva mullas toimuva bioakumulatsiooni katsemeetodi kasutamise kohta. Käesolevas katsemeetodis viidatud täiendavad dokumendid on käesoleva lisa peatükk C.13 „Biokontsentratsioon: kaladega läbivoolukatse” (49) ja OECD katsejuhend nr 315 „Bioakumulatsioon setetes elavates põhjaloomadest väheharjasussides” (53). Käesoleva katsemeetodi jaoks on tähtsad teabeallikad ka praktilised kogemused mulla bioakumulatsiooni uuringutega ja asjaomased väljaanded (näiteks 1, 5, 11, 12, 28, 40, 43, 45, 57, 59, 76, 78, 79).
4. Käesolev katsemeetod on peamiselt kasutatav stabiilsete neutraalsete orgaaniliste kemikaalide puhul, mis kalduvad adsorbeeruma mullal. Käesoleva katsemeetodi abil võib olla võimalik uurida mullaga seonduvate stabiilsete metallorgaaniliste ühendite bioakumulatsiooni. Seda saab kasutada ka metallide ja muude mikroelementide puhul.

EELTINGIMUSED

5. Mulla väheharjasussides kemikaali bioakumulatsiooni mõõtmise katseid on tehtud raskmetallidega (vt näiteks 63) ja püsivate orgaaniliste kemikaalidega, millel on väike $\log K_{ow}$ väärtus vahemikus 3,0–6,0, vt näiteks 40. Neid katseid kasutatakse järgmiste ainete puhul:

— kemikaalid, mille $\log K_{ow}$ on suurem kui 6,0 (väga hüdrofoobsed kemikaalid);

▼ **M4**

- kemikaalid, mis kuuluvad teadaolevalt elusorganismides bioakumuleeruda võivate orgaaniliste kemikaalide hulka, näiteks pindaktiivsed või väga suure adsorptsioonivõimega kemikaalid;
 - kemikaalid, mille struktuuri alusel võib oletada bioakumulatsiooni, näiteks teadaolevalt bioakumuleeruvate kemikaalide analoogid;
 - metallid.
6. Enne uuringu alustamist tuleks uuritava kemikaali kohta teha kindlaks sellised andmed nagu tavanimetus, keemiline nimetus (eelistatavalt Rahvusvahelise Puhta Keemia ja Rakenduskeemia Liidu (IUPAC) nimetus), struktuurivalem, CASi registreerimisnumber, puhtus, ohutusabinõud, säilitamistingimused ja analüüsimeetodid. Lisaks peaks olema teada järgmine teave:
- a) lahustuvus vees;
 - b) oktanooli/vee jaotuskoefitsient, K_{ow} ;
 - c) mulla/vee jaotuskoefitsient, K_{oc} ;
 - d) aururõhk;
 - e) lagunduvus (näiteks mullas, vees);
 - f) teada olevad metaboliidid.
7. Võib kasutada radiomärgistatud või radiomärgistamata uuritavat kemikaali. Analüüsi lihtsustamiseks soovitatakse siiski kasutada radiomärgistatud kemikaali. Otsus tehakse tuvastuspiiride alusel või lähtudes sellest, kas on vaja mõõta uuritavat lähtekemikaali ja metaboliite. Kui kasutatakse radiomärgistatud uuritavat kemikaali ja mõõdetakse radioaktiivsete jääkide kogusisaldust, siis on tähtis, et mullas ja katseorganismis leiduvates radiomärgisega jääkides määrataks uuritava lähtekemikaali panus ja muude märgisega kemikaalide panus, näiteks statsionaarses olekus või omastamisfaasi lõpus võetud proovides, et oleks võimalik arvutada uuritava lähtekemikaali ja asjakohaste mulla metaboliitide bioakumulatsioonitegur (vt punkt 50). Siin kirjeldatud meetodit võib olla vaja muuta, näiteks selleks, et tagada piisav biomass radiomärgistamata orgaanilise uuritava kemikaali või metallide mõõtmiseks. Kui mõõdetakse radioaktiivsete jääkide kogusisaldust (vedelik-stsintillatsiooni loenduriga pärast ekstraheerimist, põletamist või koe lahustamist), põhineb bioakumulatsioonitegur uuritaval lähtekemikaalil ja metaboliitidel. Eelistatavalt peaks bioakumulatsiooniteguri arvutamine põhinema uuritava lähtekemikaali kontsentratsioonil organismides ja radioaktiivsete jääkide kogusisaldusel. Seejärel tuleks arvutada bioakumulatsiooniteguri alusel elustiku-mulla akumulatsioonitegur, mis on normeeritud ussi lipiidisisalduse ja mulla orgaanilise süsiniku sisalduse järgi, et erinevate bioakumulatsiooni katsete tulemusi oleks võimalik võrrelda.
8. Peaks olema teada uuritava kemikaali mürgisus katses kasutatava liigi jaoks, näiteks toimet avaldav kontsentratsioon (EC_x) või letaalne kontsentratsioon (LC_x) omastamisfaasis (vt näiteks 19). Kasutatava analüüsimeetodi järgi tuleks uuritava kemikaali kontsentratsioon valida nii, et see oleks eelistatavalt ligikaudu 1 % kemikaali ägedast asümptootilisest LC₅₀ väärtusest ja vähemalt kümme korda suurem kui kemikaali tuvastamispiir mullas. Andmete olemasolu korral tuleks eelistada subletaalsete näitajate pikaajaliste uuringutega saadud mürgisusnäitajaid (51, 52). Kui selliseid andmeid ei ole, annab kasulikku teavet ägeda mürgisuse katse (vt näiteks 23).

▼M4

9. Kättesaadav peaks olema asjakohane teadaoleva täpsuse ja tundlikkusega analüüsimeetod kemikaali kvantitatiivse sisalduse mõõtmiseks katselahustes, mullas ja bioloogilises materjalis, samuti andmed proovi valmistamise ja säilitamise kohta ning materjali ohutuskaardid. Samuti peaksid teada olema uuritava aine analüütilised tuvastuspiirid mullas ja usside kudedes. Kui kasutatakse ^{14}C -märgisega uuritavat kemikaali, peaks olema teada eriradioaktiivsus (s.o Bq mol^{-1}) ja lisanditega seotud radioaktiivsuse protsent. Uuritava kemikaali eriradioaktiivsus peaks olema piisavalt suur, et võimaldada analüüsi, ja katses kasutatavad kontsentratsioonid ei tohiks olla mürgised.
10. Katset on võimalik teha tehismullaga või loodusliku mullaga. Enne katse algust tuleks teada kasutatava loodusliku mulla omadusi, näiteks mulla või selle koostisosade päritolu, pH-d, orgaanilise süsiniku sisaldust, osakeste suurusjaotust (liiva, tolmu ja savi protsent) ning veemahutavust (3, 48).

KATSE PÕHIMÕTE

11. Uuritava kemikaali bioakumulatsiooni iseloomustavate parameetrite hulka kuuluvad bioakumulatsioonitegur, omastamise kiiruskonstant (k_c) ja kõrvaldamise kiiruskonstant (k_e). Mõisted on esitatud 1. liites.
12. Katse koosneb kahest faasist: omastamise (kokkupuute) faas ja kõrvaldamise (kokkupuutejärgne) faas. Omastamisfaasi ajal puutuvad paralleelproovide usside rühmad kokku mullaga, mida on rikastatud uuritava kemikaaliga. Lisaks katseloomadele hoitakse identsetes tingimustes, aga ilma uuritava kemikaalita, usside kontrollrühmi. Mõõdetakse katseorganismide kuivkaalu ja lipiidisisaldust. Seda võib teha kontrollrühma ussidega. Kontrollrühma usside ja mullaproovide analüüsimise teel on võimalik leida analüütilised taustnäitajad (kontrollnäitajad). Kõrvaldamisfaasi ajaks kantakse ussid üle uuritava kemikaalita mulda. Kõrvaldamisfaas on alati vajalik, v.a juhul, kui kokkupuutefaasi ajal uuritavat kemikaali oluliselt ei omastatud. Kõrvaldamisfaas annab teavet kiiruse kohta, millega uuritavat kemikaali katseorganismidest väljutatakse (vt näiteks 27). Kui omastamisfaasi ajal statsionaarse olekuni ei jõuta, peaks kineetiliste parameetrite (kineetiline bioakumulatsioonitegur, omastamise ja kõrvaldamise kiiruskonstant/-konstandid) määramine põhinema eelistatavalt omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi tulemuste samaaegsel sobitamisel kineetilise mudeliga. Uuritava kemikaali kontsentratsiooni ussides/ussidel jälgitakse katse kõigi faaside vältel.
13. Omastamisfaasi ajal tehakse mõõtmisi proovivõtu aegadel kuni 14 päeva (valgeliimuklased) või 21 päeva (vihmaussid), kuni on jõutud statsionaarse olekuni (11, 12, 67). Statsionaarne olek on saavutatud, kui ussides oleva kontsentratsiooni ajast sõltuvuse graafik jääb ajateljega paralleelseks ja vähemalt kahepäevase vahemikuga võetud kolme järjestikuse proovi kontsentratsioonianalüüsi tulemused ei erine üksteisest statistiliste võrdluste (näiteks variatsioonanalüüs, regressioonanalüüs) alusel rohkem kui $\pm 20\%$.
14. Kõrvaldamisfaas hõlmab katseorganismide ülekandmist nõudesse, mis sisaldavad sama substraati ilma uuritava kemikaalita. Kõrvaldamisfaasi ajal tehakse mõõtmisi proovivõtu aegadel 14 päeva vältel (valgeliimuklased) või 21 päeva vältel (vihmaussid), v.a juhul, kui varasemad analüütilised määramised näitasid uuritava kemikaali jääkide 90 % vähenemist ussides. Uuritava kemikaali kontsentratsioon ussides kõrvaldamisfaasi lõpus teatakse kõrvaldamata jääkidenäitajana. Statsionaarse oleku bioakumulatsioonitegur

▼ **M4**

arvutatakse eelistatavalt ussides oleva kontsentratsiooni (Ca) ja mullas oleva kontsentratsiooni (Cs) suhtena näilise statsionaarse oleku korral ja ka kineetilise bioakumulatsioonitegurina, mis on mullast omastamise kiiruskonstandi (k_s) ja kõrvaldamise kiiruskonstandi (k_d) (vt mõisted, 1. liide) suhe; seejuures eeldatakse esimest järku reaktsiooni kineetikat (vt arvutused, 2. liide). Kui esimest järku reaktsiooni kineetika ei ole ilmselgelt kohaldatav, tuleks kasutada muid mudeleid.

15. Omastamise kiiruskonstant, kõrvaldamise kiiruskonstant (või muude mudelitega seotud konstandid), kineetiline bioakumulatsioonitegur ja võimaluse korral iga nimetatud parameetri usalduspiirid arvutatakse teoreetilise mudeli võrranditest (vt juhised, 2. liide). Mudeli sobivust katseandmetega saab hinnata näiteks korrelatsioonikordaja või determinatsioonikordaja järgi (kui kordaja läheneb 1-le, kirjeldab mudel katseandmeid hästi) või hii-ruut-testiga. Mudeli sobivust võib samuti näidata määratava parameetri standardhälbe või usaldusvahemiku suurus.

16. Väga lipofiilse uuritava kemikaali katsetulemuste varieeruvuse vähendamiseks tuleks bioakumulatsioonitegureid väljendada lipiidisisalduse ja orgaanilise süsiniku sisalduse suhte alusel (kg mulla orgaanilist süsinikku ussi lipiidisisalduse kg kohta). See lähenemisviis põhineb asjaolul, et mõne kemikaaliklassi puhul on bioakumulatsiooni tõenäosus selgelt seotud lipofiilsusega; kalade puhul on see täpselt kindlaks tehtud (47). Kõnealuste kemikaalide bioakumulatsioon sõltub kalade lipiidisisaldusest. Põhjaloomade puhul on leitud samalaadseid korrelatsioone, vt näiteks 30, 44. See korrelatsioon on samuti tõendatud mulla väheharjasusside puhul, vt näiteks 5, 6, 7, 14. Kui usside biomassi on piisavalt, saab katseloomade lipiidisisalduse määrata samast bioloogilisest materjalist, millest määrati uuritava kemikaali kontsentratsiooni. Alternatiivselt võib lipiidisisalduse mõõtmiseks kasutada kontrollrühma loomi.

KATSE KEHTIVUS

17. Katse kehtivuse tagamiseks peavad nii kontrollrühmade kui ka katserühmade puhul olema täidetud järgmised kriteeriumid:
 - katse lõpus ei tohiks kogusuremus omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi ajal ületada 10 % (vihmaussid) või 20 % (valgeliimuklased) kasutatud usside koguarvust;

 - *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* puhul ei tohiks omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi lõpus mõõdetud keskmine massi kadu ületada 20 % võrrelduna algse toorkaaluga kummagi faasi alguses.

MEETODI KIRJELDUS**Katses kasutatavad liigid**

18. Bioakumulatsiooni katsetamisel soovitatakse kasutada mitut mulla väheharjasusside liiki. Enim kasutatavaid liike *Eisenia fetida* või *Eisenia andrei* (*Lumbricidae*) või *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* või *Enchytraeus luxuriosus* (*Enchytraeidae*) on kirjeldatud 5. liites.

▼ **M4****Seadmed**

19. Tuleks olla tähepanelik, et vältida seadmete kõigis osades selliste materjalide kasutamist, mis võivad lahustuda, uuritavat kemikaali adsorbeerida või muid kemikaale eraldada ja avaldada katseloomadele kahjulikku mõju. Kooskõlas koormuse määraga, s.o katseusside arvuga, võib kasutada tava-päraseid ristkülikukujulisi või silindrilisi nõusid, mis on valmistatud keemiliselt inertsest materjalist ja on sobiva mahuga. Katse kasvukeskkonnaga kokku puutuvates seadmetes võib kasutada roostevaba terast, plastikut või klaasi. Katsenõud peaksid olema korralikult kaetud, et vältida usside põgenemist, võimaldades samas piisavat õhuvarustust. Suure adsorptsioonikoefitsiendiga kemikaalide korral (näiteks sünteetilised püretroidid) võib olla vaja kasutada silaanitud klaasi. Sellistel juhtudel tuleb seadmed pärast kasutamist ära visata (49). Tuleks takistada radiomürgistatud uuritavate ainete ja lenduvate kemikaalide väljapääsemist. Katsenõudest auruvate jääkide väljapääsemise vältimiseks tuleks kasutada separaatoreid (näiteks klaaspudelid gaasi pesemiseks), mis sisaldavad sobivaid absorbente.

Muld

20. Katsemuld peaks olema sellise kvaliteediga, mis võimaldab katseorganismidel selles elada ja eelistatavalt paljuneda aklimatiseerumise ja katse ajavahemike vältel, ilma et neil tekiks ebatavalisi muutusi välimuses või ebatavalist käitumist. Ussid peaksid saama mulda kaevuda.
21. Katsetes soovitatakse substraadina kasutada käesoleva lisa peatükis C.8 (48) kirjeldatud tehismulda. Bioakumulatsiooni katsetes kasutatava tehismulla valmistamine ja soovitused tehismulla säilitamiseks on esitatud 4. liites. Õhu käes kuivatatud tehismulda võib kuni kasutamiseni säilitada toatemperatuuril.
22. Katsemullana ja/või kultuuri kasvumullana võib siiski kasutada looduslikku mulda saastumata kohtadest. Loodusliku mulla kirjeldamisel tuleks esitada vähemalt järgmised andmed: päritolu (võtmise koht), pH, orgaanilise süsiniku sisaldus, osakeste suurusjaotus (liiva, aleuriidi ja savi protsent), maksimaalne veemahutavus ja veesisalduse protsent (3). Kasulikku teavet peaks andma mulla või selle koostisosade mikrosaasteainete analüüsi tegemine enne kasutamist. Kui kasutatakse põllumulda, siis ei tohiks seda olla töödeldud taimekaitsevahenditega ega väetatud töödeldud loomade sõnnikuga vähemalt üks aasta ning orgaanilise väetisega vähemalt kuus kuud enne proovivõttu (50). Loodusliku mulla käsitlemise meetodeid enne väheharjasussidega tehtavates ökotoksikoloogilistes laborikatsetes kasutamist on kirjeldatud väljaandes 3. Loodusliku mulla puhul tuleks laboris säilitamise aeg hoida võimalikult lühikesena.

Uuritava kemikaali kasutamine

23. Uuritav kemikaal viiakse mulla sisse. Seejuures tuleks arvesse võtta kemikaali füüsikalisi-keemilisi omadusi. Vees lahustuv uuritav kemikaal tuleks enne mullaga segamist vees täielikult lahustada. Halvasti vees lahustuva uuritava kemikaali puhul soovitatakse üks või mitu (tehislüki) mulla koostisosa katta uuritava kemikaaliga. Näiteks kvartslüki või osa sellest võib immutada sobivas orgaanilises lahustis lahustatud uuritava kemikaaliga; seejärel aurustatakse lahusti aeglaselt kuni kuivamiseni. Kemikaaliga kaetud mullakomponendi saab seejärel segada niiske mulla sisse. Selle meetodi

▼ **M4**

peamine eelis on see, et lahustit mulda ei lisata. Kui kasutatakse looduslikku mulda, võib uuritavat kemikaali lisada mulla õhu käes kuivatatud osa rikastamise teel, nagu on kirjeldatud eespool tehniliku mulla puhul, või uuritava kemikaali ja niiske mulla segamisega, kasutades seejärel aurustamise etappi (kui kasutatakse lahustit). Üldiselt tuleks võimaluste piires vältida niiske mulla kokkupuudet lahustitega. Arvestada tuleks järgmist (3):

- kui vee asemel kasutatakse muud lahustit, peaks see olema veega segunev ja/või seda peaks olema võimalik kõrvaldada (näiteks aurustada), nii et mulda jääb ainult uuritav kemikaal;
 - kui kasutatakse lahusti kontrollrühma, ei ole negatiivne kontrollrühm vajalik. Lahusti kontrollkatses tuleks kasutada mullale lisatud lahusti suurimat kontsentratsiooni ja lahusti peaks olema samast partiist, mida kasutati põhilahuse valmistamisel. Sobiva lahusti valimisel peaksid peamised kriteeriumid olema lahusti mürgisus ja lenduvus ning uuritava kemikaali lahustuvus valitud lahustis.
24. Vees ja orgaanilistes lahustites halvasti lahustuva kemikaali korral võib soovitud katsekonsentratsiooni saamiseks segada uuritava kemikaali kogusega 2,0–2,5 g (näiteks uhmri ja nuia abil) peeneks jahvatatud kvartslüüva katsenõu kohta. See kvartslüüva ja uuritava kemikaali segu lisatakse eelnevalt niisutatud mullale ning segatakse sellega põhjalikult läbi ja lisatakse vajalik kogus deioniseeritud vett, et saada sobiv niiskusesisaldus. Lõplik segu jaotatakse katsenõudesse. Protseduuri korratakse iga katsekonsentratsiooni puhul ja samuti valmistatakse ette sobiv kontrollkatsenõu, kus on 2,0–2,5 g peeneks jahvatatud kvartslüüva katsenõu kohta.
25. Pärast rikastamist tuleks määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon mullas. Enne katseorganismide lisamist tuleks kontrollida, et uuritav kemikaal oleks mullas jaotunud ühtlaselt. Katseprotokollis kirjeldatakse rikastamiseks kasutatud meetodit ja esitatakse konkreetse rikastamismeetodi valimise põhjused (24).
26. Ideaaljuhul tuleks enne organismide lisamist kindlaks teha, et mulla- ja pooriveefaasi vahel on tekkinud tasakaaluolek; soovituslik on neljapäevane ajavahemik 20 °C juures. Vees halvasti lahustuva orgaanilise kemikaali puhul võib adsorbeerunud ja lahustunud fraktsiooni tegeliku tasakaaluolekuni jõudmiseks kuluda päevi või kuid. Olenevalt uuringu eesmärgist, näiteks keskkonnatingimuste imiteerimisel, võib rikastatud mulda vanandada kauem, näiteks metallide puhul kolm nädalat temperatuuril 20 °C (22).

Katseorganismide kultuurid

27. Usse tuleks eelistatavalt pidada alalises laborikultuuris. Suunised *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* ning *Enchytraeidae* sugukonna liikide laborikultuuri meetodite kohta on esitatud 5. liites (vt ka 48, 51, 52).
28. Katsetes kasutatavatel ussidel ei tohiks olla nähtavaid haigusi, hälbeid ega parasiite.

KATSE KÄIK

29. Katseorganismid puutuvad uuritava kemikaaliga kokku omastamisfaasi ajal. Omastamisfaasi kestus peaks olema 14 päeva (valgeliimuklased) või 21 päeva (vihmaussid), v.a juhul, kui tõendatakse statsionaarse olekuni jõudmist.

▼ **M4**

30. Kõrvaldamisfaasi ajaks kantakse ussid üle uuritava kemikaalita mulda. Esimene proov tuleks võtta 4–24 tunni möödumisel kõrvaldamisfaasi algusest. 21-päevase omastamisfaasi ja 21-päevase kõrvaldamisfaasi proovivõtu ajakavade näidised on esitatud 3. liites.

Katseorganismid

31. Mitme mulla valgeliimuklase liigi isendi kaal on väga väike (näiteks märgkaal 5–10 mg isendi kohta *Enchytraeus albidus*’e puhul ja veel väiksem *Enchytraeus crypticus*’e või *Enchytraeus luxuriosus*’e puhul); kaalu mõõtmiseks ja keemiliste analüüside tegemiseks võib olla vaja koondada paralleelproovi katsenõude ussid (s.o ühe koeanalüüsi tulemuse saamiseks kasutatakse kõiki paralleelproovi nõu usse). Igale paralleelproovile lisatakse 20 valgeliimuklase isendit ja kasutada tuleks vähemalt kolme paralleelproovi. Kui uuritava kemikaali analüütiline tuvastuspiir on kõrge, võib osutuda vajalikuks kasutada rohkem usse. Suurema isendi massiga katseliikide (*Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei*) korral võib kasutada ühte isendit sisaldivaid paralleelproovide nõusid.
32. Katses kasutatavad vihmaussid peaksid olema sarnase massiga (näiteks *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* isendi mass peaks olema 250–600 mg). Valgeliimuklaste (näiteks *Enchytraeus albidus*’e) pikkus peaks olema ligikaudu 1 cm. Kõik konkreetsetes katses kasutatavad ussid peaksid olema sama päritoluga ja tegemist peaks olema *clitellum*’iga täiskasvanud isenditega (vt 5. liide). Kuna looma mass ja vanus võivad bioakumulatsioonitegurit mõjutada (näiteks erineva lipiidisisalduse ja/või munade olemasolu tõttu), tuleks need parameetrid täpselt registreerida ja neid tuleks tulemuste tõlgendamisel arvesse võtta. Lisaks sellele võivad kokkupuutefaasi vältel lisanduda kookonid, mis mõjutavad samuti bioakumulatsioonitegurit. Keskmiste märg- ja kuivmasside hindamiseks soovitatakse enne katset kaaluda katseuside alamproovi.
33. Tuleks kasutada suurt mulla ja usside suhtarvu, et uuritava kemikaali kontsentratsiooni vähenemine mullas omastamisfaasi ajal oleks minimaalne. *Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* korral on soovituslik vähemalt 50 g mulla kuivmassi ussi kohta ja valgeliimuklaste puhul vähemalt 10–20 g mulla kuivmassi katsenõu kohta. Nõud peaksid sisaldama 2–3 cm (valgeliimuklased) või 4–5 cm (vihmaussid) mullakihti.
34. Katses kasutatud ussid kõrvaldatakse kultuurist (näiteks valgeliimuklased juveliriipintsettide abil). Täiskasvanud isendid kantakse üle töötlemata katsemulda aklimatiseerumiseks ja neid söödetakse (vt punkt 36). Kui katsetingimused erinevad kultuuri tingimustest, peaks ussidele katsetingimustega kohanemiseks piisama 24–72-tunnisest aklimatiseerumisfaasist. Pärast aklimatiseerumist loputatakse vihmausse, tõstes nad puhta veega klaasnõusse (näiteks Petri tassile), ja seejärel kaalutakse vihmaussid enne katsemulda panemist. Enne kaalumist tuleks liigne vesi ussi küljest kõrvaldada, puudutades ussiga õrnalt tassi serva või kuivatades ettevaatlikult veidi niisutatud paberrätikuga.
35. Tuleks jälgida katseorganismide kaevumiskäitumist ja see tuleks registreerida. Vihmaussidega tehtavates katsedes kaevuvad loomad (kontrollrühmas ja töötlsruühmas) tavaliselt paari tunniga mulla sisse; seda tuleks kontrollida usside katsenõudesse panemisest hiljemalt 24 tunni möödumisel. Kui vihmaussid mulda ei kaevu (näiteks omastamisfaasist rohkem kui poole

▼M4

möödumisel rohkem kui 10 %), siis see näitab, et kas ei ole katsetingimused sobivad või ei ole katseorganismid terved. Sellisel juhul tuleks katse peatada ja seda tuleks korrata. Valgeliimuklased elavad peamiselt mullaosakestevahelistes poorides ja nende välispind võib ümbritseva substraadiga sageli ainult osaliselt kokku puutuda; kaevunud ja mittekaevunud valgeliimuklaste kokkupuude eeldatakse olevat samaväärne ning eeldatakse, et valgeliimuklaste mittekaevumise puhul ei pruugi katse kordamine vajalik olla.

Söötmine

36. Vähese orgaanilise süsiniku kogusisaldusega mulla kasutamise korral tuleks ette näha söötmine. Tehismulla kasutamise korral soovatakse vihmaussidele iga nädal (s.o usse tuleks sööta kord nädalas) sööta 7 mg kuivatatud sõnnikut mulla kuivmassi g kohta ja valgeliimuklaste puhul iga nädal 2–2,5 mg jahvatatud kaerahelbeid mulla kuivmassi g kohta (11). Esimene söödakogus tuleks segada mullaga vahetult enne katseorganismide lisamist. Eelistatavalt tuleks kasutada sama tüüpi sööta, mida kasutatakse kultuuris (vt 5. liide).

Valgus ja temperatuur

37. Katse tuleks teha kontrollitud valgustustsükliga 16 tundi valgust / 8 tundi pimedust, valgustatus katsenõu piirkonnas eelistatavalt 400–800 luks (3). Katsetemperatuur peaks olema kogu katse vältel 20 ± 2 °C.

Katsekonsentratsioonid

38. Kasutatakse ühte kontsentratsiooni. Täiendava(te) kontsentratsiooni(de) kasutamise vajadust tuleks põhjendada. Kui uuritava kemikaali mürgisus (EC_x) on ligilähedane analüütilise tuvastuspiiriga, siis on soovitatav kasutada suure eriradioaktiivsusega radiomärgistatud uuritavat kemikaali. Metallide puhul peaks kontsentratsioon ületama koe ja mulla taustaset.

Paralleelproovid

39. Kineetiliste mõõtmiste puhul (omastamisfaas ja kõrvaldamisfaas) peaks kemikaaliga töödeldud paralleelproovide arv olema vähemalt kolm iga proovivõtupunkti kohta. Ettevalmistatud paralleelproovide koguarv peaks olema piisav, et hõlmata kõik proovivõtuajad omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi ajal.
40. Kui lahustina kasutatakse ainult vett, tuleks bioloogiliste vaatluste ja mõõtmiste jaoks (näiteks kuiv- ja märgmassi suhe, lipiidisisaldus) ning usside ja mulla taustkontsentratsioonide analüüsiks ette näha vähemalt 12 negatiivse kontrollrühma paralleelproovinõu (millest neljast võetakse proov alguses, neljast omastamise lõpus ja neljast kõrvaldamise lõpus). Kui uuritava kemikaali lisamiseks kasutatakse lahustavat ainet, tuleks lisaks kemikaaliga töödeldud paralleelproovidele kasutada ka lahusti kontrollrühma (neljast paralleelproovi nõust tuleks võtta proov alguses, neljast omastamisfaasi lõpus ja neljast kõrvaldamisfaasi lõpus), mis hõlmab kõiki koostisosi peale uuritava aine. Sel juhul võib samuti ette näha negatiivse kontrollrühma neli täiendavat paralleelproovi nõud (ilma lahustita) valikuliseks proovivõtuks omastamisfaasi lõpus. Neid paralleelproove võib võrrelda bioloogiliselt lahusti kontrollrühmaga, et saada teavet lahusti võimaliku mõju kohta katseorganismile. Soovitatakse ette näha piisav kogus täiendavaid paralleelproovi varunõusid (näiteks kaheksa) kemikaaliga töötlemise ja kontrollrühma(de) jaoks.

▼ **M4****Mulla kvaliteedi mõõtmise sagedus**

41. Mulla pH-d, niiskusesisaldust ja temperatuuri (pidevalt) katseruumis tuleks mõõta omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi alguses ja lõpus. Kord nädalas tuleks kontrollida mulla niiskusesisaldust, kaaludes katsenõusid ja võrreldes tegelikku massi katse alguse esialgse massiga. Veekadu tuleks kompenseerida deioniseeritud vee lisamisega.

Usside ja mulla proovide võtmine ja analüüsimine

42. Vihmausside ja valgeliimuklaste bioakumulatsiooni katsete omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi ajakava näidis on esitatud 3. liites.
43. Katsenõudest võetakse mullaproov, et määrata uuritava kemikaali kontsentratsioon enne usside lisamist ning omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi ajal. Katse ajal määratakse uuritava kemikaali kontsentratsioonid ussides ja mullas. Tavaliselt mõõdetakse mulla kogukontsentratsioone. Soovi korral võib mõõta poorivee kontsentratsioone; sel juhul tuleks enne uuringu alustamist formuleerida põhjendus ja ette näha asjakohased meetodid ning esitada need katseprotokollis.
44. Ussidest ja mullast võetakse proovid vähemalt kuuel korral omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi vältel. Kui on tõendatud, et uuritav kemikaal on stabiilne, võib mullaproovide arvu vähendada. Omastamisfaasi alguses ja lõpus soovitatakse analüüsida vähemalt kolme paralleelproovi. Kui omastamisfaasi lõpus mõõdetud kontsentratsioon mullas erineb algsest kontsentratsioonist rohkem kui 30 %, tuleks analüüsida ka muudel kuupäevadel võetud mullaproove.
45. Kõrvaldage konkreetse paralleelproovi ussid igal proovivõtukorral mullast (näiteks pärast paralleelproovi mulla laotamist madalale alusele ja kasutades usside tõstmiseks pehmeid juveliiripintsette) ja loputage neid kiiresti veega madalas klaasis või terasalusel. Eemaldage liigne vesi (vt punkt 34). Tõstke ussid ettevaatlikult eelnevalt kaalutud nõusse ja kaaluge nad, sh nende soolestiku sisu, viivitamata.
46. Vihmaussidel (*Eisenia* sp.) tuleks lasta seejärel oma soolestiku sisu öö jooksul väljutada, näiteks kaetud Petri tassil olevale niiskele filterpaberile (vt punkt 34). Pärast väljutamist tuleks teha kindlaks usside kaal, et hinnata katse vältel võimalikku biomassi vähenemist (vt kehtivuse kriteeriumid punktis 17). Valgeliimuklaste kaalumise ja kudede analüüs viiakse ellu ilma väljutamiseta, kuna see on nende usside väiksuse tõttu tehniliselt keerukas. Pärast lõplikku massi määramist tuleks ussid viivitamata kõige asjakohasema meetodi abil surmata (näiteks vedela lämmastiku abil või külmutamisega temperatuurini alla $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$).
47. Kõrvaldamisfaasi ajal asendavad ussid saastunud soolestiku sisu puhta mullaga. See tähendab, et vahetult enne kõrvaldamisfaasi võetud väljutamata soolestiku sisuga usside (praegusel juhul valgeliimuklased) proovid sisaldavad saastunud mulda. Veekeskonna väheharjasusside puhul eeldatakse, et pärast esialgset 4–24-tunnist kõrvaldamisfaasi on enamik saastunud soolestiku sisust asendatud puhta settega, vt näiteks 46. Samalaadsetest tulemustest on teatatud vihmausside puhul radiomärgistatud kaadmiumi ja tsiingi akumulatsiooni uuringutes (78). Väljutamata soolestiku sisuga valgeliimuklaste puhul võidakse käsitada kõnealust kõrvaldamisfaasi esimese proovi kontsentratsiooni kui kudede kontsentratsiooni pärast soolestiku tühjendamist. Uuritava aine kontsentratsiooni saastamata mullast tingitud lahjenemise arvessevõtmiseks kõrvaldamisfaasis võib hinnata soolestikusisalduse massi ussi märgmassist / ussi tuha massist või ussi kuivmassi / ussi tuha massi suhetest.

▼M4

48. Mulla- ja ussiproove tuleks eelistatavalt analüüsida viivitamata pärast kõrvaldamist (s.o 1–2 päeva jooksul), et vältida lagunemist või muid kadusid, ja katse vältel on soovitatav arvutada ligikaudseid omastamis- ja kõrvaldamismäärasid. Kui analüüs tehakse hiljem, tuleks proove säilitada sobiva meetodi abil, näiteks sügavkülmutamise teel (≤ -18 °C).
49. Tuleks kontrollida, et keemilise analüüsi täpsus ja reprodutseeritavus ning uuritava kemikaali saagis mulla- ja ussiproovidest oleks kõnealuse meetodi jaoks rahuldav; tuleks registreerida ekstraktsiooni tõhusus, tuvastuspiir ja määramispiir. Samuti tuleks kontrollida, et kontrollnõudes ei oleks uuritava kemikaali kontsentratsioon suurem tausttasemest. Kui uuritava kemikaali kontsentratsioon katseorganismis Ca on kontrollrühma ussides > 0 , tuleks seda arvestada kineetiliste parameetrite arvutamisel (vt 2. liide). Kõiki proove tuleks kogu katse vältel käsitleda nii, et minimeeritaks kaod ja saastumine (näiteks proovivõtuseadmele uuritava kemikaali adsorbeerumise tõttu).
50. Radiomärgistatud uuritava kemikaaliga töötamisel on võimalik analüüsida lähteainet ja metaboliite. Uuritava lähtekemikaali ja metaboliitide kvantitatiivne määramine statsionaarses olekus või omastamisfaasi lõpus annab olulist teavet. Proove tuleks seejärel „puhastada”, et oleks võimalik määrata eraldi uuritava lähtekemikaali kogust. Kui mõne metaboliidi radioaktiivsus moodustab üle 10 % analüüsitud proovi(de) koguradioaktiivsusest, on soovitatav kõnealused metaboliidid tuvastada.
51. Uuritava kemikaali üldsaagis ning ussides, mullast ja aurunud uuritava kemikaali püüdmiseks kasutatavatest absorbente sisaldavatest püüduritest (kui neid kasutatakse) määratud saagised tuleks registreerida ja esitada katseprotokollis.
52. Konkreetsest katsenõust võetud isendite proovide koondamine on lubatav vihmaussist väiksemate valgeliimuklaste puhul. Kui koondamine tähendab paralleelproovide arvu vähenemist, piirab see statistilisi meetodeid, millega on võimalik andmeid töödelda. Kui on vaja kasutada teatavat statistilist meetodit ja tagada andmete täpsus, tuleks proovide koondamist arvestades kasutada katses piisavat arvu paralleelproovidega katsenõusid selle tagamiseks.
53. On soovitatav, et bioakumulatsioonitegur oleks väljendatud nii summaarse kuivmassi funktsioonina kui ka vajaduse korral (näiteks väga hüdrofoobse kemikaali puhul) lipiidisisalduse funktsioonina. Lipiidisisalduse määramiseks tuleks kasutada asjakohaseid meetodeid (selleks tuleks kasutada mõnd olemasolevat meetodit, vt näiteks 31, 58). Nende meetodite puhul kasutatakse ekstraheerimist kloroformi/metanooliga. Klooritud lahustite kasutamise vältimiseks tuleks siiski kasutada Blighi ja Dyeri meetodi (9) muudetud versiooni (17). Kuna eri meetodid ei pruugi anda sama tulemust, on tähtis kirjeldada kasutatud meetodit. Kui see on võimalik, s.o kui usside kude on piisavalt, tuleks lipiidide analüüs teha ideaaljuhul sama proovi või ekstraktiga, mida kasutati uuritava kemikaali analüüsiks, kuna lipiidid tuleb ekstraktist sageli kõrvaldada, enne kui ekstrakti on võimalik kromatograafiliselt analüüsida (49). Alternatiivselt võib lipiidisisalduse mõõtmiseks kasutada kontrollrühma loomi, lipiidisisaldust on vaja teada bioakumulatsiooniteguri näitajate normeerimiseks. Viimasel juhul väheneb seadmete saastumine uuritava kemikaaliga.

▼ **M4****ANDMED JA KATSEPROTOKOLLI KOOSTAMINE****Tulemuste töötlemine**

54. Uuritava kemikaali omastamise kõvera saamiseks kantakse aritmeetilises skaalas graafikule kemikaali kontsentratsioon ussides/ussidel omastamisfaasis sõltuvana ajast. Kui kõver on jõudnud platoole või statsionaarsesse olekusse (vt mõisted, 1. liide), arvutatakse statsionaarse oleku bioakumulatsioonitegur järgmise võrrandi alusel:

$$\frac{C_a \text{ stats. olekus või omastamisfaasi lõpus (keskmine)}}{C_s \text{ stats. olekus või omastamisfaasi lõpus (keskmine)}}$$

C_a on uuritava kemikaali kontsentratsioon katseorganismis;

C_s on uuritava kemikaali kontsentratsioon mullas.

55. Kui statsionaarse olekuni ei jõuta, tuleks statsionaarse oleku bioakumulatsiooniteguri asemel määrata kiiruskonstantidel põhinev kineetiline bioakumulatsioonitegur, nagu on kirjeldatud allpool:

— määratakse akumulatsioonitegur (BAF_K) suhtena k_s/k_e ;

— omastamise ja kõrvaldamise kiirused arvutatakse eelistatavalt ühel ajal (vt 2. liide, võrrand 11);

— kõrvaldamise kiiruskonstant (k_e) määratakse tavaliselt kõrvaldamise kõvera alusel (s.o kõrvaldamisfaasis ussides leiduva uuritava aine kontsentratsiooni graafikust). Omastamise kiiruskonstant k_s arvutatakse seejärel k_e ja C_a väärtuse alusel, mis tuletatakse omastamise kõverast – nende meetodite kirjeldus on esitatud 2. liites. Kineetilise bioakumulatsiooniteguri ja kiiruskonstantide k_s ja k_e saamiseks eelistatud meetod on kasutada arvutis mittelineaarseid parameetri hindamise meetodeid. Kui kõrvaldamine ei ole ilmselgelt esimest järku, tuleks kasutada keerukamaid mudeleid.

Katseprotokoll

56. Katseprotokollis esitatakse alljärgnev teave.

Uuritav kemikaal:

— kogu kättesaadav teave, milles käsitletakse uuritava kemikaali ägedat ja pikaajalist mürgisust (näiteks EC_x , LC_x , täheldatava toimeta kontsentratsioon) mullas elavatele väheharjasussidele;

— puhtus, füüsikaline olek ja füüsikalised-keemilised omadused, näiteks $\log K_{ow}$, lahustuvus vees;

— kemikaali tunnusandmed; uuritava aine päritolu, kasutatud lahusti nimetus ja kontsentratsioon;

— kui kasutatakse radiomärgistatud uuritavat kemikaali, siis märgistatud aatomite täpne asukoht, eriradioaktiivsus ja radiokeemiline puhtus.

Katseliik:

— teaduslik nimetus, liin, päritolu, kõik eeltötlused, aklimatiseerumine, vanus, suuruse vahemik jms.

▼ **M4***Katsetingimused:*

- kasutatud katsemeetod;
- kasutatud valgustuse tüüp ja omadused ning valgustuse kestus(ed);
- katse kava (näiteks katsenõude arv ja suurus, mulla mass ja mullakihi paksus, paralleelproovide arv, usside arv paralleelproovi kohta, katsekontsentratsioonide arv, omastamisaasi ja kõrvaldamisaasi kestus, proovivõtu sagedus);
- katsenõu materjali valiku põhjendus;
- uuritava aine valmistamise ja kasutamise meetod ning samuti konkreetse meetodi valimise põhjused;
- nominaalsed katsekontsentratsioonid, mõõdetud väärtuste keskmised ja nende standardhälbed katsenõudes ning hälvete arvutamise meetod;
- tehismulla koostisosade päritolu või looduslike kasvukeskkondade kasutamisel mulla päritolu, eeltöötlemise kirjeldus, kontrollrühmade tulemused (elulemus, biomassi teke, paljunemine), mulla omadused (pH, orgaanilise süsiniku kogusisaldus, osakeste suurusjaotus (liiva, aleuriidi ja savi protsent), maksimaalne veemahutavus, veesisalduse protsent katse alguses ja lõpus ning kõik muud tehtud mõõtmised);
- üksikasjalik teave mulla- ja ussiproovide töötlemise kohta, sh andmed uuritava aine valmistamise, säilitamise, rikastamismeetodite, ussidest ja mullast ekstraheerimise ja analüüsimise meetodite (ning täpsuse) kohta ning lipiidisisalduse kohta (kui mõõdeti) ja uuritava aine analüüsisaagiste kohta.

Tulemused:

- kontrollrühma usside ja iga katsenõu usside suremus ning mis tahes täheldatud ebatavaline käitumine (näiteks mulla vältimine, mittepaljunemine valgeliikumuklastega tehtavates bioakumulatsiooni katsetes);
- mulla ja katseorganismide kuivmassi ja märgmassi suhe (mis on vajalik normeerimise jaoks);
- usside märgmassid igal proovivõtuajal; vihmausside puhul märgmassid katse alguses ja igal proovivõtukorral enne ja pärast soolestiku tühendamist;
- katseorganismide lipiidisisaldus (kui määrati);
- kõverad, mis näitavad uuritava kemikaali omastamise ja kõrvaldamise kineetikat ussides ja statsionaarse olekuni jõudmiseks vajalikku aega;
- C_a ja C_s (standardhälbe ja vahemikuga, kui see on asjakohane) kõigi proovivõtuaegade kohta (C_a väljendatud g-des kogu keha märg- ja kuivmassi kg^{-1} kohta, C_s väljendatud g-des mulla märg- ja kuivmassi kg^{-1} kohta). Kui on vaja leida elustiku-mulla akumulatsioonitegur (näiteks eri lipiidisisaldusega loomadega tehtud katsete tulemuste võrdlemiseks), võib C_a olla väljendatud ka g-des organismi lipiidisisalduse kg^{-1} kohta ja C_s võib olla väljendatud g-des mulla orgaanilise süsiniku kg^{-1} kohta;
- samuti võib esitada järgmised näitajad: bioakumulatsioonitegur (väljendatuna mulla kg alusel ussi kg^{-1} kohta), mullast omastamise kiiruskonstant k_s (väljendatuna mulla g alusel usside kg^{-1} ja päeva $^{-1}$ kohta) ning kõrvaldamise kiiruskonstant k_e (väljendatuna päeva $^{-1}$ kohta); elustiku-mulla akumulatsioonitegur (väljendatuna mulla kg-des orgaanilise süsiniku kg^{-1} kohta ja ussi lipiidisisalduse alusel);

▼ **M4**

— kui neid mõõdetakse, siis lähtekemikaali protsendid, metaboliidid ja seotud jäägid (s.o uuritava kemikaali protsent, mida ei saa tavapäraste ekstraheerimismeetodite abil ekstraheerida), mis on tuvastatud mullas ja katseloomades;

— andmete statistiliste analüüside jaoks kasutatud meetodid.

Tulemuste hindamine:

— tulemuste vastavus kehtivuskriteeriumidele, mis on loetletud punktis 17;

— ootamatud või ebatavalised tulemused, näiteks uuritava kemikaali mittemäielik kõrvaldamine katseloomadest.

KIRJANDUS

- 1) Amorim M (2000). Chronic and toxicokinetic behavior of Lindane (γ -HCH) in the Enchytraeid *Enchytraeus albidus*. Master thesis, University Coimbra.
- 2) ASTM (2000). Standard guide for the determination of the bioaccumulation of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. American Society for Testing and Materials, E 1688-00a.
- 3) ASTM International (2004). Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the Lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the Enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM International, E1676-04: 26 pp.
- 4) Beek B, Boehling S, Bruckmann U, Franke C, Joehncke U, Studinger G (2000). The assessment of bioaccumulation. In Hutzinger, O. (editor), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 2 Part J (Vol. editor: B. Beek): Bioaccumulation - New Aspects and Developments. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 235–276.
- 5) Belfroid A, Sikkenk M, Seinen W, Van Gestel C, Hermens J (1994). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in soil. Environ. Toxicol. Chem. 13: 93–99.
- 6) Belfroid A, Van Wezel A, Sikkenk M, Van Gestel C, Seinen W & Hermens J (1993). The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworms (*Eisenia andrei*): Experiments in water. Ecotox. Environ. Safety 25: 154–165.
- 7) Belfroid A, Meiling J, Drenth H, Hermens J, Seinen W, Van Gestel C (1995). Dietary uptake of superlipophilic compounds by earthworms (*Eisenia andrei*). Ecotox. Environ. Safety 31: 185–191.
- 8) Bell AW (1958). The anatomy of *Enchytraeus albidus*, with a key to the species of the genus *Enchytraeus*. Ann. Mus. Novitat. 1902: 1–13.
- 9) Bligh EG and Dyer WJ (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Pysiol. 37: 911–917.
- 10) Bouche M (1972). Lombriciens de France. Ecologie et Systematique. INRA, Annales de Zoologie-Ecologie animale, Paris, 671 p.
- 11) Bruns E, Egeler Ph, Moser T, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001a). Standardisierung und Validierung eines Bioakkumulationstests mit terrestrischen Oligochaeten. Report to the German Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Berlin), R&D No.: 298 64 416.
- 12) Bruns E, Egeler Ph, Römbke J, Scheffczyk A, Spörlein P (2001b). Bioaccumulation of lindane and hexachlorobenzene by the oligochaetes *Enchytraeus luxuriosus* and *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). Hydrobiologia 463: 185–196.
- 13) Conder JM and Lanno RP (2003). Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. J. Soils Sediments 3: 13–20.

▼M4

- 14) Connell DW and Markwell RD (1990). Bioaccumulation in the Soil to Earthworm System. *Chemosphere* 20: 91–100.
- 15) Didden WAM (1993). Ecology of Terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia* 37: 2–29.
- 16) Didden WAM (2003). Oligochaeta, In: Bioindicators and biomonitors. Markert, B.A., Breure, A.M. & Zechmeister, H.G. (eds.). Elsevier Science Ltd., The Netherlands, pp. 555–576.
- 17) De Boer J, Smedes F, Wells D, Allan A (1999). Report on the QUASH interlaboratory study on the determination of total-lipid in fish and shellfish. Round 1 SBT-2, Exercise 1000, EU, Standards, Measurement and Testing Programme.
- 18) Dietrich DR, Schmid P, Zweifel U, Schlatter C, Jenni-Eiermann S, Bachmann H, Bühler U, Zbinden N (1995). Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A Case Study. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29: 140–145.
- 19) Euroopa Parlamendi ja nõukogu määrus (EÜ) nr 1907/2006, 18. detsember 2006, mis käsitleb kemikaalide registreerimist, hindamist, autoriseerimist ja piiramist (REACH) ning millega asutatakse Euroopa Kemikaaliamet, muudetakse direktiivi 1999/45/EÜ ja tunnistatakse kehtetuks nõukogu määrus (EMÜ) nr 793/93, komisjoni määrus (EÜ) nr 1488/94 ning samuti nõukogu direktiiv 76/769/EMÜ ja komisjoni direktiivid 91/155/EMÜ, 93/67/EMÜ, 93/105/EÜ ja 2000/21/EÜ (ELT L 396, 30.12.2006, lk 1).
- 20) Edwards CA and Bohlen PJ (1996). *Biology and ecology of earthworms*. Third Edition, Chapman & Hall, London, 426 pp.
- 21) OECD (2008). Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- 22) Egeler Ph, Gilberg D, Scheffczyk A, Moser Th and Römbke J (2009). Validation of a Soil Bioaccumulation Test with Terrestrial Oligochaetes by an International Ring Test (Validierung einer Methode zur standardisierten Messung der Bioakkumulation mit terrestrischen Oligochaeten). Report to the Federal Environmental Agency (Umweltbundesamt Dessau-Rosslau), R&D No.: 204 67 458: 149 pp. Allalaaditav aadressil <http://www.oecd.org/dataoecd/12/20/42552727.pdf>.
- 23) Elmegaard N and Jagers op Akkerhuis GAJM (2000). Safety factors in pesticide risk assessment, Differences in species sensitivity and acute-chronic relations. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325: 57 pp.
- 24) Environment Canada (1995). Guidance document on measurement of toxicity test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Environmental Protection Series Report EPS 1/RM/30.
- 25) EPPO (2003). Environmental Risk Assessment scheme for plant protection products. Soil organisms and functions, EPPO (European Plant Protection Organization) Standards, Bull, OEPP/EPPO 33: 195–208.
- 26) Franke C (1996). How meaningful is the bioconcentration factor for risk assessment? *Chemosphere* 32: 1897–1905.
- 27) Franke C, Studinger G, Berger G, Böhling S, Bruckmann U, Cohors-Fresenborg D, Jöhncke U (1994). The assessment of bioaccumulation. *Chemosphere* 29: 1501–1514.
- 28) Füll C (1996). Bioakkumulation und Metabolismus von -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (Lindan) und 2-(2,4-Dichlorphenoxy)-propionsäure (Dichlorprop) beim Regenwurm *Lumbricus rubellus* (Oligochaeta, Lumbricidae). Dissertation University Mainz, 156 pp.

▼ **M4**

- 29) Füll C, Schulte C, Kula C (2003). Bewertung der Auswirkungen von Pflanzenschutzmitteln auf Regenwürmer. UWSF - Z. Umweltchem, Ökotox. 15: 78–84.
- 30) Gabric A.J, Connell DW, Bell PRF (1990). A kinetic model for bioconcentration of lipophilic compounds by oligochaetes. Wat. Res. 24: 1225–1231.
- 31) Gardner WS, Frez WA, Cichocki EA, Parrish CC (1985). Micromethods for lipids in aquatic invertebrates. Limnology and Oceanography 30: 1099–1105.
- 32) Hawker DW and Connell DW (1988). Influence of partition coefficient of lipophilic compounds on bioconcentration kinetics with fish. Wat. Res. 22: 701–707.
- 33) Hund-Rinke K and Wiechering H (2000). Earthworm avoidance test for soil assessments: An alternative for acute and reproduction tests. J. Soils Sediments 1: 15–20.
- 34) Hund-Rinke K, Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Beurteilung der Lebensraumfunktion von Böden mit Hilfe von Regenwurmtests. In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisen-träger, A. (eds.), Spektrum Verl., Heidelberg, 59–81.
- 35) ISO 11268-2 (1998). Soil Quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction.
- 36) Jaenike J (1982). „*Eisenia foetida*” is two biological species. Megadrilogica 4: 6–8.
- 37) Jager T (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (Oligochaeta). Environ. Toxicol. Chem. 17: 2080–2090.
- 38) Jager T, Sanchez PA, Muijs B, van der Welde E, Posthuma L (2000). Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Eisenia andrei* (Oligochaeta) using spiked soil. Environ. Toxicol. Chem. 19: 953–961.
- 39) Jager T, Baerselman R, Dijkman E, De Groot AC, Hogendoorn EA, DeJong A, Kruitbosch JAW, Peijnenburg W J G. M (2003a). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons to earthworms (*Eisenia andrei*, Oligochaeta) in field-polluted soils and soil-sediment mixtures. Environ. Toxicol. Chem. 22: 767–775.
- 40) Jager T, Fleuren RLJ, Hoogendoorn E, de Korte G (2003b). Elucidating the routes of exposure for organic chemicals in the earthworm, *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Environ. Sci. Technol. 37: 3399–3404.
- 41) Janssen MPM, Bruins A, De Vries TH, Van Straalen NM (1991). Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20: 305–312.
- 42) Kasprzak K (1982). Review of enchytraeid community structure and function in agricultural ecosystems. Pedobiologia 23: 217–232.
- 43) Khalil AM (1990). Aufnahme und Metabolismus von ¹⁴C-Hexachlorbenzol und ¹⁴C-Pentachlornitrobenzol in Regenwürmern. Dissertation University München, 137 pp.
- 44) Landrum PF (1989). Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. Environ. Sci. Toxicol. 23: 588–595.
- 45) Marinussen MPJC, Van der Zee SEATM, De Haan FA (1997). Cu accumulation in *Lumbricus rubellus* under laboratory conditions compared with accumulation under field conditions. Ecotox. Environ. Safety 36: 17–26.
- 46) Mount DR, Dawson TD, Burkhard LP (1999). Implications of gut purging for tissue residues determined in bioaccumulation testing of sediment with *Lumbriculus variegatus*. Environ. Toxicol. Chem. 18: 1244–1249.

▼ M4

- 47) Nendza M (1991). QSARs of bioaccumulation: Validity assessment of log K_{ow} /log BCF correlations, In: R. Nagel and R. Loskill (eds.): Bioaccumulation in aquatic systems, Contributions to the assessment, Proceedings of an international workshop, Berlin 1990, VCH, Weinheim.
- 48) Käesoleva lisa peatükk C.8 „Toksilisus vihmaussidele”.
- 49) Käesoleva lisa peatükk C.13 „Biokontsentratsioon: kaladega läbivoolukatse”.
- 50) Käesoleva lisa peatükk C.21 „Mullamikroobid: lämmastiku transformatsiooni katse”.
- 51) OECD (2004a). Enchytraeid reproduction test, Test Guideline No. 220, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- 52) OECD (2004b). Earthworm reproduction test (*Eisenia fetida*/*Eisenia Andrei*), Test Guideline No. 222, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- 53) OECD (2008). Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, Test Guideline No. 315, Guidelines for the testing of chemicals, OECD, Paris.
- 54) Petersen H and Luxton M (1982). A comparative analysis of soil fauna populations and their role in decomposition processes. *Oikos* 39: 287–388.
- 55) Phillips DJH (1993). Bioaccumulation. In: Handbook of Ecotoxicology Vol. 1. Calow P. (ed.). Blackwell Scientific Publ., Oxford. 378–396.
- 56) Pflugmacher J (1992). Struktur-Aktivitätsbestimmungen (QSAR) zwischen der Konzentration von Pflanzenschutzmitteln und dem Octanol-Wasser-Koeffizienten UWSF- *Z. Umweltchem. Ökotox.* 4: 77–81.
- 57) Posthuma L, Weltje L, Anton-Sanchez FA (1996). Joint toxic effects of cadmium and pyrene on reproduction and growth of the earthworm *Eisenia fetida*. RIVM Report No. 607506001, Bilthoven.
- 58) Randall RC, Lee II H, Ozretich RJ, Lake JL, Pruell RJ (1991). Evaluation of selected lipid methods for normalising pollutant bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 10: 1431–1436.
- 59) Römbke J, Egele, P, Füll C (1998). Literaturstudie über Bioakkumulations-tests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. UBA-Texte 28/98, 84 S.
- 60) Römbke J and Moser Th (1999). Organisation and performance of an international ring-test for the validation of the Enchytraeid reproduction test. UBA-Texte 4/99: 373 pp.
- 61) Römbke J, Riepert F, Achazi R (2000). Enchytraeen als Testorganismen, In: Toxikologische Beurteilung von Böden. Heiden, S., Erb, R., Dott, W. & Eisentraeger, A. (eds.). Spektrum Verl., Heidelberg. 105–129.
- 62) Romijn CA,FM, Luttk R, Van De Meent D, Slooff W, Canton JH (1993). Presentation of a General Algorithm to Include Effect Assessment on Secondary Poisoning in the Derivation of Environmental Quality Criteria, Part 2: Terrestrial food chains. *Ecotox. Envir. Safety* 27: 107–127.
- 63) Sample BE, Suter DW, Beauchamp JJ, Efroymson RA (1999). Literature-derived bioaccumulation models for earthworms: Development and validation. *Environ. Toxicol. Chem.* 18: 2110–2120.
- 64) Schlosser H-J and Riepert F (1992). Entwicklung eines Prüfverfahrens für Chemikalien an Bodenraubmilben (*Gamasina*), Teil 2: Erste Ergebnisse mit Lindan und Kaliumdichromat in subletaler Dosierung. *Zool. Beitr. NF* 34: 413–433.
- 65) Schmelz R and Collado R (1999). *Enchytraeus luxuriosus* sp. nov., a new terrestrial oligochaete species (Enchytraeide, Clitellata, Annelida). *Carolinea* 57: 93–100.

▼ **M4**

- 66) Sims R W and Gerard BM (1985). Earthworms, In: Kermack, D. M. & Barnes, R. S. K. (Hrsg.): Synopses of the British Fauna (New Series) No. 31. 171 S. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- 67) Sousa JP, Loureiro S, Pieper S, Frost M, Kratz W, Nogueira AJA, Soares AMVM (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* 19: 2557–2563.
- 68) Spacie A and Hamelink JL (1982). Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 1, 309–320.
- 69) Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP (1998). Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: *Advances in earthworm ecotoxicology*. S. Sheppard, J. Bembridge, M. Holmstrup, L. Posthuma (eds.). Setac Press, Pensacola, 67–81.
- 70) Sterenborg I, Vork NA, Verkade SK, Van Gestel CAM, Van Straalen NM (2003). Dietary zinc reduces uptake but not metallothionein binding and elimination of cadmium in the springtail *Orchesella cincta*. *Environ. Toxicol. Chemistry* 22: 1167–1171.
- 71) UBA (Umweltbundesamt) (1991). Bioakkumulation - Bewertungskonzept und Strategien im Gesetzesvollzug. UBA-Texte 42/91. Berlin.
- 72) US EPA (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. Second Edition, EPA 600/R-99/064, US, Environmental Protection Agency, Duluth, MN, March 2000.
- 73) Van Brummelen TC and Van Straalen NM (1996). Uptake and elimination of benzo(a)pyrene in the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31: 277–285.
- 74) Van Gestel CAM. (1992). The influence of soil characteristics on the toxicity of chemicals for earthworms; a review, In: *Ecotoxicology of Earthworms* (Ed. Becker, H, Edwards, PJ, Greig-Smith, PW & Heimbach, F). Intercept Press, Andover (GB).
- 75) Van Gestel CA and Ma W-C (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* 21: 1023–1033.
- 76) Van Straalen NM, Donker MH, Vijver MG, van Gestel CAM (2005). Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* 136: 409–417.
- 77) Venter JM and Reinecke AJ (1988). The life-cycle of the compost-worm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *South African J. Zool.* 23: 161–165.
- 78) Vijver MG, Vink JPM, Jager T, Wolterbeek HT, van Straalen NM, van Gestel CAM (2005). Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol, Biochem.* 37: 1843–1851.
- 79) Widianarko B and Van Straalen NM (1996). Toxicokinetics-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 402–406.

▼ **M4***1. liide***MÕISTED**

Bioakumulatsioon – uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismil, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga ümbritsevas kasvukeskkonnas. Bioakumulatsioon on biokontsentratsiooni ja biomagnifikatsiooni (vt allpool) tulemus.

Biokontsentratsioon – uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismil ainult ümbritsevast kasvukeskkonnast kemikaali omastamise teel (näiteks keha pinna ja allaneelatud mulla kaudu), võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga ümbritsevas kasvukeskkonnas.

Biomagnifikatsioon – uuritava kemikaali kontsentratsiooni suurenemine organismis või organismil peamiselt saastunud toidu või saagi kaudu omastamise teel, võrreldes uuritava kemikaali kontsentratsiooniga toidus või saagis. Biomagnifikatsioon võib viia uuritava aine ülekandumise või kogunemiseni toiduvõrgustikes.

Uuritava kemikaali **kõrvaldamine** – kemikaali kadumine katseorganismi kudedest aktiivsete või passiivsete protsesside tõttu, mis tekivad, sõltumata uuritava aine olemasolust või selle puudumisest ümbritsevas kasvukeskkonnas.

Bioakumulatsioonitegur (BAF) – uuritava kemikaali kontsentratsioon katseorganismis/katseorganismil (C_a , g-des ussi kuivmassi kg kohta) kõnealuse bioakumulatsiooni katse omastamisfaasis igal ajamomendil jagatuna kemikaali kontsentratsiooniga ümbritsevas kasvukeskkonnas (C_s , g-des mulla kuivmassi kg kohta); bioakumulatsiooniteguri ühikud on mulla kg ussi kg kohta.

Statsionaarse oleku bioakumulatsioonitegur (BAF_{ss}) – bioakumulatsioonitegur statsionaarse oleku puhul, see ei muutu oluliselt pika ajavahemiku jooksul; uuritava kemikaali kontsentratsioon ümbritsevas kasvukeskkonnas (C_s , g-des mulla kuivmassi kg kohta) jääb selle ajavahemiku vältel püsivaks.

Bioakumulatsioonitegurid, mis arvutatakse otse mullast omastamise kiiruskonstandist ja kõrvaldamise kiiruskonstandist (k_s ja k_e , vt allpool), on kineetilised bioakumulatsioonitegurid (BAF_k).

Elustiku-mulla akumulatsioonitegur (BSAF) – lipiidide suhtes normeeritud uuritava kemikaali kontsentratsioon katseorganismis/katseorganismil, jagatuna uuritava kemikaali orgaanilise süsiniku suhtes normeeritud kontsentratsiooniga mullas statsionaarses olekus. C_a on sel juhul väljendatud g-des organismi lipiidide kg kohta ja C_s g-des mulla orgaanilise aine kg kohta; elustiku-mulla akumulatsiooniteguri ühikud on kg orgaanilist süsinikku lipiidi kg kohta.

Platoo või **statsionaarne olek** – määratletud kui tasakaaluolek omastamise ja kõrvaldamise protsesside vahel, mis toimuvad kokkupuutefaasis ühel ja samal ajal. Statsionaarne olek saavutatakse bioakumulatsiooniteguri ajast sõltuvuse graafikul, kui kõver muutub ajateljega paralleelseks ja vähemalt kahepäevase vahemikuga võetud proovide bioakumulatsiooniteguri kolm järjestikust analüüsi jäävad üksteisest 20 % piiresse ning kolme proovivõtu ajavahemiku vahel ei ole statistiliselt olulisi erinevusi. Uuritavate kemikaalide puhul, mida omastatakse aeglasemalt, oleksid sobivamad seitsmepäevased ajavahemikud (49).

Orgaanilise süsiniku-vee jaotuskoeffitsient (K_{oc}) – kemikaali kontsentratsiooni suhe mulla orgaanilise süsiniku fraktsioonis/fraktsioonil ja kemikaali kontsentratsioon vees tasakaaluoleku puhul.

Oktanooli-vee jaotuskoeffitsient (K_{ow}) – kemikaali lahustuvuse suhe n-oktanoolis ja vees tasakaaluolekus, mida vahel tähistatakse ka P_{ow} -ga. K_{ow} logaritmi ($\log K_{ow}$) kasutatakse kui kemikaali võimaliku veeorganismidesse kogunemise (bioakumulatsiooni) üht näitajat.

▼ M4

Omastamis- või kokkupuutefaas – aeg, mille vältel katseorganismid puutuvad kokku uuritava kemikaaliga.

Mullast omastamise kiiruskonstant (k_s) – numbriline väärtus, millega määratakse uuritava aine kontsentratsiooni suurenemise kiirus katseorganismil/katseorganismis, mille on põhjustanud omastamine mullafaasist; k_s mõõdetakse mulla g-des usside kg ja päeva kohta.

Kõrvaldamisfaas – aeg, mis järgneb katseorganismide ülekandmisele uuritava ainega rikastatud kasvukeskkonnast uuritava aineta kasvukeskkonda, mille vältel uuritakse kemikaali kõrvaldamist katseorganismidest (või netokadu).

Kõrvaldamise kiiruskonstant (k_e) – numbriline väärtus, millega määratakse uuritava aine kontsentratsiooni vähenemise kiirus katseorganismil/katseorganismis pärast katseorganismide ülekandmist uuritavat ainet sisaldavast kasvukeskkonnast uuritava aineta kasvukeskkonda; k_e ühik on d^{-1} .

Uuritav kemikaal – iga aine või segu, mida uuritakse käesoleva katsemeetodi abil.

▼ **M4**

2. liide

Omastamise ja kõrvaldamise parameetrite arvutamine

Bioakumulatsiooni katse peamine näitaja on bioakumulatsioonitegur, BAF. Bioakumulatsioonitegurit on võimalik mõõtmistulemustest arvutada, kui stacionaarse oleku kontsentratsioon katseorganismis (C_a) jagatakse kontsentratsiooniga mullas (C_s). Kui omastamisfaasi ajal stacionaarse olekuni ei jõuta, siis arvutatakse kiiruskonstantidest stacionaarse oleku bioakumulatsiooniteguri asemel kineetiline bioakumulatsioonitegur. Siiski tuleks ära märkida, kas bioakumulatsioonitegur põhineb stacionaarse oleku kontsentratsioonidel või mitte.

Tavapärane meetod kineetilise bioakumulatsiooniteguri (BAF_K), mullast omastamise kiiruskonstandi (k_s) ja kõrvaldamise kiiruskonstandi (k_e) leidmiseks on kasutada arvutitöötluses mittelineaarseid parameetri hindamise meetodeid, näiteks väljaandes 68 kirjeldatud mudelite alusel. Järjestikuste kontsentratsiooni ajast sõltuvuse andmete komplekti ja mudeli võrrandite puhul

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{võrrand 1}]$$

või

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{võrrand 2}],$$

kus

C_a = kemikaali kontsentratsioon ussides (g märg- või kuivmassi kg^{-1})

k_s = omastamise kiiruskonstant koes (mulla g ussi $\text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)

C_s = kemikaali kontsentratsioon mullas (g märg- või kuivmassi kg^{-1})

k_e = kõrvaldamise kiiruskonstant (d^{-1})

t_c = aeg omastamisfaasi lõpus,

saab nende arvutiprogrammidega arvutada BAF_K , k_s ja k_e väärtused.

Kui kontrollkatse (kemikaaliga mitte kokkupuutuvate) usside taustkontsentratsioon, näiteks päeval 0, erineb märkimisväärselt nullist (see võib nii olla näiteks metallide puhul), tuleks kõnealune taustkontsentratsioon ($C_{a,0}$) lisada võrranditesse, muutes neid järgmiselt:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{võrrand 3}]$$

ja

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad [\text{võrrand 4}]$$

Kui täheldatakse uuritava kemikaali kontsentratsiooni märkimisväärselt vähenemist mullas omastamisfaasi vältel, võib kasutada järgmisi mudeleid (67, 79):

$$C_s = C_0 (e^{-k_0 t}) \quad [\text{võrrand 5}],$$

▼ **M4**

kus

C_s = kemikaali kontsentratsioon mullas (g märg- või kuivmassi kg^{-1})

k_0 = lagunemise kiiruskonstant mullas (d^{-1})

C_0 = kemikaali esialgne kontsentratsioon mullas (g märg- või kuivmassi kg^{-1})

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{võrrand 6}]$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t_c} - e^{-k_e t_c} * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad [\text{võrrand 7}],$$

kus

C_a = kemikaali kontsentratsioon ussides (g märg- või kuivmassi kg^{-1})

k_s = omastamise kiiruskonstant koes (mulla g ussi $\text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$)

k_0 = lagunemise kiiruskonstant mullas (d^{-1})

k_e = kõrvaldamise kiiruskonstant (d^{-1})

t_c = aeg omastamisfaasi lõpus.

Kui statsionaarse olekuni jõutakse omastamisfaasi vältel (s.o $t = \infty$), siis võib võrrandi 1

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad [\text{võrrand 1}]$$

taandada kujule:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

või

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad [\text{võrrand 8}]$$

Sel juhul on $k_s/k_e \times C_s$ lähenemine uuritava aine kontsentratsioonile ussi kudedes statsionaarses olekus ($C_{a,ss}$).

Elustiku-mulla akumulatsioonitegurit (BSAF) saab arvutada järgmiselt:

$$\text{BSAF} = \text{BAF}_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad [\text{võrrand 9}],$$

kus f_{oc} on mulla orgaanilise süsiniku fraktsioon ja f_{lip} on ussi lipiidifraktsioon, mis on mõlemad eelistatavalt määratud katse ajal võetud proovidest ja põhinevad vastavalt kas kuivmassil või märgmassil.

Kõrvaldamise kineetikat on võimalik modelleerida, kasutades kõrvaldamisfaasi andmeid ja kohaldades järgmist mudelvõrrandit ning arvutipõhist mittelineaarset parameetri hindamise meetodit. Kui aja järgi graafikule kantud andmepunktid näitavad pidevat eksponentsiaalset uuritava aine kontsentratsiooni vähenemist loomades, siis võib ajast sõltuva kõrvaldamise kirjeldamiseks kasutada ühekambri-mudelit (võrrand 9).

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad [\text{võrrand 10}]$$

▼ **M4**

Kõrvaldamisprotsessid näivad vahel olevat kahefaasilised, näidates C_a kiiret vähenemist kõrvaldamisfaasi alguses, mis hiljem muutub uuritava aine aeglasemaks kaoks kõrvaldamise hilisemates järkudes, vt näiteks 27, 68. Kahte faasi on võimalik tõlgendada eeldusega, et organismis on kaks eraldi kambrit, millest uuritav aine kaob erineva kiirusega. Neil juhtudel tuleks vaadata asjakohaseid väljaandeid, näiteks 38, 39, 40, 78.

Eespool esitatud mudelvõrrandite abil võib kineetilised parameetrid (k_s ja k_e) arvutada ka korraga, kohaldades esimese järgu kineetika mudelit korraga kõigile omastamisfaasi ja kõrvaldamisfaasi andmetele. Omastamise ja kõrvaldamise kiiruskonstantide sellise kombineeritud arvutamise meetodi kirjeldus on esitatud väljaannetes 40, 72 ja 69.

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s (1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1) \right] + \left[\frac{K_s}{k_e} \times C_s (e^{-K_e(t-t_0)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2) \right] \quad [\text{võrrand 11}]$$

Märkus. Kui omastamise ja kõrvaldamise parameetreid hinnatakse korraga omastamise ja kõrvaldamise ühendatud andmetest, võimaldab võrrandis 11 kasutatud näitaja m arvutiprogrammil seostada võrrandi alamliikmeid vastava faasi andmekomplektidega ja võrrandit õigesti rakendada ($m = 1$ omastamisfaasi korral; $m = 2$ kõrvaldamisfaasi korral).

Sellest hoolimata tuleks mudelvõrrandeid kasutades olla ettevaatlik, eelkõige kui katse ajal võib muutuda uuritava kemikaali biosaadavus või esineb kemikaali (bio)lagunemine (vt näiteks 79).

▼ **M4**

3. liide

MULLA BIOAKUMULATSIOONI KATSETE AJAVAKAVADE NÄITED**Katse vihmaussidega**

- a) Omastamisfaas kineetika arvutamiseks kasutatava kaheksa proovivõtu kuupäevaga

Päev	Tegevus
-6	Ettevalmistatud mulla kohandamine 48 tunni vältel.
-4	Mulla fraktsiooni rikastamine uuritava kemikaali lahusega; lahusti aurustamine; mulla koostisosade segamine; mulla jaotamine katsenõudesse; katsetingimustel tasakaalustamine nelja päeva vältel (kolme nädala vältel metalliga rikastatud mulla korral).
-3 kuni -1	Katseorganismide eraldamine kultuurist aklimatiseerumiseks; mulla koostisosade ettevalmistamine ja niisutamine.
0	Temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mullaproovide võtmine töödeldud nõudest ja lahusti kontrollkatse nõudest uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks; söödaratsiooni lisamine; usside kaalumise ja randomiseeritud jaotamine katsenõudesse; usside piisavate allproovide säilitamine analüütiliste taustnäitajate, märg- ja kuivmassi ning lipiidisisalduse määramiseks; kõigi katsenõude kaalumise mulla niiskuse kontrollimiseks; õhuvarustuse kontrollimine, kui kasutatakse suletud katsesüsteemi.
1	Õhuvarustuse kontrollimine, usside käitumise ja temperatuuri registreerimine; mulla- ja usside proovide võtmine uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks.
2	Sama kui päeval 1.
3	Õhuvarustuse, usside käitumise ja temperatuuri kontrollimine.
4	Sama kui päeval 1.
5-6	Sama kui päeval 3.
7	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
8-9	Sama kui päeval 3.
10	Sama kui päeval 1.
11-13	Sama kui päeval 3.
14	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
15-16	Sama kui päeval 3.
17	Sama kui päeval 1.
18-20	Sama kui päeval 3.

▼ **M4**

Päev	Tegevus
21	Sama kui päeval 1; temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel; omastamisfaasi lõpp; usside ülekandmine allesolevatest kokkupuute paralleelproovidest kõrvaldamisfaasi jaoks puhast mulda sisaldavatesse nõudesse (ilma soolestiku tühjendamiseta); mulla- ja usside proovide võtmine lahustis kontrollrühmades.
	Kokkupuute-eelsed tegevused (tasakaalustamise faas) tuleks ajakavas määrata uuritava kemikaali omadusi arvesse võttes.
	Päeva 3 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).

b) Kõrvaldamisfaas

Päev	Tegevus
-6	Mulla koostisosade ettevalmistamine ja niisutamine; ettevalmistatud mulla kohandamine 48 tunni vältel.
-4	Mulla koostisosade segamine; mulla jaotamine katsenõudesse; inkubeerimine katsetingimustes neli päeva.
0 (omastamisfaasi lõpp)	Temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; usside kaalumine ja randomiseeritud jaotamine katsenõudesse; söödaratsiooni lisamine; usside ülekandmine allesolevatest kokkupuute paralleelproovidest puhast mulda sisaldavatesse nõudesse; mulla- ja usside proovide võtmine 4–6 tunni pärast uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks.
1	Õhuvarustuse kontrollimine, usside käitumise ja temperatuuri registreerimine; mulla- ja usside proovide võtmine uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks.
2	Sama kui päeval 1.
3	Õhuvarustuse, usside käitumise ja temperatuuri kontrollimine.
4	Sama kui päeval 1.
5–6	Sama kui päeval 3.
7	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
8–9	Sama kui päeval 3.
10	Sama kui päeval 1.
11–13	Sama kui päeval 3.
14	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
15–16	Sama kui päeval 3.
17	Sama kui päeval 1.

▼ **M4**

Päev	Tegevus
18–20	Sama kui päeval 3.
21	Sama kui päeval 1; temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel; mulla- ja usside proovide võtmine lahusti kontrollrühmadest.
	Mulla ettevalmistamine enne kõrvaldamisfaasi tuleks teha samal viisil kui enne omastamisfaasi.
	Päeva 3 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).

Katse valgeliimuklastega

- a) Omastamisfaas kineetika arvutamiseks kasutatava kaheksa proovivõtu kuupäevaga

Päev	Tegevus
–6	Ettevalmistatud mulla kohandamine 48 tunni vältel.
–4	Mulla fraktsiooni rikastamine uuritava kemikaali lahusega; lahusti aurustamine; mulla koostisosade segamine; mulla jaotamine katsenõudesse; katsetingimustel tasakaalustamine nelja päeva vältel (kolme nädala vältel metalliga rikastatud mulla korral).
–3 kuni –1	Katseorganismide eraldamine kultuurist aklimatiseerumiseks; mulla koostisosade ettevalmistamine ja niisutamine.
0	Temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mullaproovide võtmine töödeldud nõudest ja lahusti kontrollkatse nõudest uuritava kemikaali kontsentratsiooni määramiseks; söödaratsiooni lisamine mulda; usside kaalumine ja randomiseeritud jaotamine katsenõudesse; usside piisavate allproovide säilitamine analüütiliste taustnäitajate, märg- ja kuivmassi ning lipiidisisalduse määramiseks; kõigi katsenõude kaalumine mulla niiskuse kontrollimiseks; õhuvarustuse kontrollimine, kui kasutatakse suletud katsesüsteemi.
1	Õhuvarustuse kontrollimine, usside käitumise ja temperatuuri registreerimine; mulla- ja usside proovide võtmine uuritava aine kontsentratsiooni määramiseks.
2	Sama kui päeval 1.
3	Õhuvarustuse, usside käitumise ja temperatuuri kontrollimine.
4	Sama kui päeval 1.
5–6	Sama kui päeval 3.
7	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine mulda; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel ja vee aurustumise kompenseerimine.
9	Sama kui päeval 1.
10	Sama kui päeval 3.

▼ M4

Päev	Tegevus
11	Sama kui päeval 1.
12–13	Sama kui päeval 3.
14	Sama kui päeval 1; söödaratsiooni lisamine mulda; temperatuuri ja mulla pH mõõtmine; mulla niiskuse kontrollimine katsenõude uuesti kaalumise teel; omastamisfaasi lõpp; usside ülekandmine allesolevatest kemikaaliga kokkupuute paralleelproovidest kõrvaldamisfaasi jaoks puhast mulda sisaldavatesse nõudesse (ilma soolestiku tühjendamiseta); mulla- ja usside proovide võtmine lahusti kontrollkatse rühmades.
	Kokkupuute-eelsed tegevused (tasakaalustamise faas) tuleks ajakavas määrata kemikaali omadusi arvesse võttes.
	Päeva 3 jaoks kirjeldatud tegevusi tuleks korrata igal päeval (vähemalt tööpäeviti).

▼ **M4**

4. liide

Tehismuld – soovitused valmistamise ja säilitamise kohta

Kuna konkreetsest allikast looduslik muld ei pruugi olla kogu aasta vältel kättesaadav ja katset võivad mõjutada seal elavad organismid ning samuti mikroaas-teained, on soovitatav kasutada katsetes tehiskliku substraati, tehismulda, vastavalt käesoleva lisa peatükile C.8 „Toksilisus vihmaussidele”(48). Selles mullas saavad ellu jääda, kasvada ja paljuneda mitmed katseliigid ning tagatakse katse- ja kultuuritingimuste maksimaalne standardiseeritus ning samuti laborisisene ja laboritevaheline võrreldavus.

Mulla koostisosad

Turvas:	10 %	Turbasammal kooskõlas OECD suunisega 207 (48).
Kvartsiiv:	70 %	Tööstuslik kvartsiiv (õhu käes kuivatatud); tera suurus: rohkem kui 50 % osakestest peaksid olema vahemikus 50–200 µm, kuid kõik osakesed peaksid olema ≤ 2 mm.
Kaoliinsavi:	20 %	Kaoliinisisaldus ≥ 30 %.
Kaltsiumkarbonaat:	≤ 1 %	CaCO ₃ , pulbriks jahvatatud, keemiliselt puhas.

Soovi korral võib tehismulla orgaanilise süsiniku sisaldust vähendada, vähendades näiteks turbasisaldust 4–5 %-le kuivast mullast ja suurendades vastavalt liivisisaldust. Sellise orgaanilise süsiniku sisalduse vähendamise teel võib uuritava kemikaali mullal adsorbeerumise (orgaaniline süsinik) võimalus väheneda ja uuritava kemikaali saadavus ussidele võib suurened (74). On tõendatud, et *Enchytraeus albidus* ja *Eisenia fetida* suudavad täita paljunemist käsitleva kehtivuskriteeriumi, kui neid katsetatakse põllumullas, millel on väiksem orgaanilise süsiniku sisaldus, näiteks 2,7 % (33, 61), ja seniste kogemuste põhjal on seda võimalik saavutada 5 % turbasisaldusega tehismullas.

Valmistamine

Mulla kuivad koostisosad segatakse põhjalikult (näiteks suuremahulises laborisegistis). Seda tuleks teha enne katse alustamist ligikaudu nädala jooksul. Segatud kuiva mulla koostisosi tuleks niisutada deioniseeritud veega vähemalt 48 tundi enne uuritava aine lisamist, et tasakaalustada/stabiliseerida happesust. pH määramiseks kasutatakse mulla ja 1 M KCl lahust suhtega 1 : 5. Kui pH ei ole nõutud vahemikus (6,0 ± 0,5), lisatakse mullale piisavas koguses CaCO₃ või valmistatakse ette uus mullapartii.

Tehismulla maksimaalne veemahutavus määratakse kooskõlas standardiga ISO 11268-2 (35). Kuiva tehismulda niisutatakse vähemalt kaks päeva enne katse alustamist, lisades piisavalt deioniseeritud või taastatud vett, et saada ligikaudu pool lõplikust veesisaldusest. Lõplik veesisaldus peaks olema 40–60 % maksimaalsest veemahutavusest. Katse alguses jagatakse eelnevalt niisutatud muld nii mitmeks partiiks, kui on katse vältel kasutatud katsekontsentratsioone ja kontrollrühmi, ning niiskusesisaldus reguleeritakse 40–60 %-le maksimaalsest veemahutavusest, kasutades uuritava aine lahust ja/või lisades deioniseeritud või taastatud vett. Niiskusesisaldus määratakse katse alguses ja lõpus (105 °C juures). See peaks olema optimaalne liikide vajaduste jaoks (niiskusesisaldust võib samuti kontrollida järgmiselt: kui mulda käes kergelt vajutatakse, siis peaksid sõrmede vahele tekkima väikesed veepiisad).

▼ M4**Säilitamine**

Tehismulla kuivi koostisosi võib toatemperatuuril säilitada kuni kasutamiseni. Valmistatud eelnevalt niisutatud mulda võib säilitada jahedas kohas kuni kolm päeva enne rikastamist; tuleks olla hoolikas, et vältida vee aurumist. Uuritava ainega rikastatud mulda tuleks kasutada viivitamata, v.a juhul, kui on andmeid selle kohta, et konkreetset mulda saab säilitada ilma uuritava aine mürgisust ja biosaadavust mõjutamata. Rikastatud mulla proove võidakse seejärel säilitada kuni analüüsini konkreetse uuritava aine jaoks soovitatavates tingimustes.

▼ **M4**

5. liide

Mulla väheharjasusside liigid, keda soovitatakse kasutada mullast toimuva bioakumulatsiooni katsete tegemiseks**Vihmaussid**

Soovitatav katseliik on *Eisenia fetida* (Savigny 1826), kes kuulub *Lumbricidae* sugukonda. Alates 1972. aastast on see jaotatud kahte alamliiki (*Eisenia fetida* ja *Eisenia andrei* (10)). Jaenike (36) kohaselt on need täiesti eraldi liigid. *Eisenia fetida* on kergesti äratuntav oma heledate segmentidevaheliste kollaste triipude poolest, aga *Eisenia andrei* värvus on ühtlaselt tumepunane. Need liigid on tõenäoliselt pärit Musta mere piirkonnast ja neid esineb praegu kõikjal maailmas eelkõige inimeste tekitatud elupaikades, nagu kompostihunnikud. Mõlemat liiki saab kasutada ökotoksikoloogilisteks ja bioakumulatsiooni katseteks.

Eisenia fetida ja *Eisenia andrei* on kaubanduslikult saadaval näiteks kalasöödana. Võrreldes muude *Lumbricidae* sugukonda kuuluvate vihmaussidega on neil lühike elutsükkel ja nad saavad (toatemperatuuril) täiskasvanuks ligikaudu kahe kuni kolme kuu vanusena. Nende optimaalne temperatuur on ligikaudu 20–24 °C. Nad eelistavad suhteliselt niiskeid substraate, mille pH on peaaegu neutraalne ja orgaanilise materjali sisaldus on suur. Kuna neid liike on standarditud ökotoksikoloogilistes katsetes ligikaudu 25 aasta vältel laialdaselt kasutatud, on nende kultuuris kasvatamine hästi dokumenteeritud (48, 77).

Mõlemat liiki saab kasvatada mitmesugustes loomsetes jäätmetes. ISO (35) alusel soovitatud kasvatamise keskkond on hobuse- või veisesõnniku ja turba segu 50 : 50. Kasvukeskkonna pH peaks olema ligikaudu 6–7 (reguleeritakse kaltsiumkarbonaadiga), kasvukeskkonnal peaks olema vähene ioonjuhtivus (vähem kui 6 mS/cm või vähem kui 0,5 % soola kontsentratsioon) ja see ei tohiks olla ammoniaagi või loomauriiniga liigselt saastunud. Samuti võib kasutada müügil olevat aiamulda, mis ei sisalda lisandeid, või tehismulda OECD (48) kohaselt või nende mõlema segu 50 : 50. Substraat peaks olema niiske, kuid mitte liiga märg. Sobivad on 10- kuni 50-liitrised kasvatuskastid.

Standardse vanuse ja massiga usside saamiseks on parim alustada kultuuri kookonitega. Seepärast lisatakse värsket substraati sisaldavasse kasvatuskasti täiskasvanud ussid kookonite saamiseks. Praktilised kogemused on näidanud, et populatsiooni tihedus ligikaudu 100 täiskasvanud ussi substraadi (märgmassi) kg kohta annab head paljunemismäärad. Pärast 28 päeva möödumist täiskasvanud ussid eemaldatakse. Kookonitest koorunud vihmausse kasutatakse katsetamiseks vähemalt 2 kuu ja mitte kauem kui 12 kuu möödumisel täiskasvanuks saamisest.

Eespool kirjeldatud liiki usse saab pidada terveks, kui nad liiguvad kogu substraadis, ei proovi substraadist lahkuda ja paljunevad pidevalt. Väga aeglane liikumine või kollane tagaosa (*Eisenia fetida* puhul) viitab substraadi kurnatusele. Sel juhul soovitatakse kasutada värsket substraati ja/või väiksemat arvu loomi kasti kohta.

Täiendavad valitud viited

Gerard BM (1964). Synopsis of the British fauna. No. 6 Lumbricidae. Linnean Soc. London, 6: 1–58.

Graff O (1953). Die Regenwürmer Deutschlands. Schr. Forsch. Anst. Landwirtschaft. 7: 1–81.

Römbke J, Egeler P, Füll C (1997). Literaturstudie über Bioakkumulationstests mit Oligochaeten im terrestrischen Medium. Bericht für das UBA F + E 206 03 909, 86 S.

Rundgren S (1977). Seasonality of emergence in lumbricids in southern Sweden. Oikos 28: 49–55.

Satchell JE (1955). Some aspects of earthworm ecology. Soil Zoology (Kevan): 180–201.

▼ **M4**

Sims RW and Gerard BM (1985). A synopsis of the earthworms. Linnean Soc. London 31: 1–171.

Tomlin AD (1984). The earthworm bait market in North America. In: Earthworm Ecology - from Darwin to vermiculture. Satchell, J.E. (ed.), Chapman & Hall, London. 331–338 pp.

Valgeliimuklased

Soovitav katseliik on *Enchytraeus albidus*, Henle 1837 (valgeliimukas). *Enchytraeus albidus* on üks suurimaid (kuni 15 mm) rõngusside hõimkonna väheharjasusside klassi *Enchytraeidae* sugukonna liike ja seda leidub kogu maailmas, vt näiteks 8. *Enchytraeus albidus*'t leidub merelistes, siseveekogude ja mullastiku elupaikades peamiselt lagunevas orgaanilises aines (vetikad, kompost) ja harvadel juhtudel niitudel (42). Kõnealune lai ökoloogiline taluvus ja mõni morfoloogiline erinevus näitab, et kõnealusel liigil võib olla erinevaid liigisiseseid rühmi.

Enchytraeus albidus on kaubanduslikult saadaval, seda müüakse kalasöödana. Tuleks kontrollida, kas kultuur on saastunud muude, enamasti väiksemate liikidega (60). Kui saastumine on toimunud, siis tuleks kõiki usse pesta veega Petri tassis. Seejärel valitakse (stereomikroskoobi abil) uue kultuuri alustamiseks *Enchytraeus albiduse* suured isendid. Kõik muud ussid visatakse ära. Liigi elutsükkel on lühike ja täiskasvanuks saadakse 33 päevaga (18 °C juures) kuni 74 päevaga (12 °C juures). Katses tuleks kasutada ainult kultuure, mida on ilma probleemideta laboris hoitud vähemalt viis nädalat (üks põlvkond).

Muud *Enchytraeus*'e perekonna liigid on samuti sobivad, eelkõige *Enchytraeus luxuriosus*. See liik elab tegelikult mullas ja seda on hiljuti kirjeldatud väljaandes (65). Kui kasutatakse muud *Enchytraeus*'e perekonna liiki, tuleks see selgelt tuvastada ja liigi valimist tuleks põhjendada.

Enchytraeus crypticus (Westheide ja Graefe 1992) on liik, mis kuulub samasse rühma kui *Enchytraeus luxuriosus*. Selle leidumist looduses ei ole veel kindlalt tuvastatud, seda on ainult kirjeldatud vihmausside kultuurides ja kompostihunnikutes (Römbke 2003). Selle algsed ökoloogilised nõuded ei ole seega teada. Hiljutised laboriuuringud erinevate alade muldadega on kinnitanud, et sellel liigil on laialdane taluvus mulla omaduste (nagu pH ja tekstuur) suhtes (Jänsch *et al.* 2005). Viimastel aastatel on seda liiki sageli kasutatud ökotoksikoloogilistes uuringutes, kuna seda on lihtne kasvatada ja katsetada, näiteks Kuperman *et al.* 2003. Isendid on siiski väikesed (3–12 mm; keskmiselt 7 mm) (Westheide & Müller 1996), mis muudab käsitlemise *Enchytraeus albidus*'ega võrreldes keerukamaks. Selle liigi kasutamisel *Enchytraeus albidus*'e asemel võib katsenõu olla väiksem, aga ei pruugi seda olla. Lisaks sellele tuleks arvesse võtta, et see liik paljuneb väga kiiresti. Selle põlvkond saab 20 ± 2 °C juures küpseks vähem kui 20 päevaga (Achazi *et al.* 1999) ja kõrgemal temperatuuril isegi kiiremini.

Enchytraeidae sugukonda kuuluvad *Enchytraeus albidus*'e liigi isendeid (ning samuti muude *Enchytraeus*'e perekonna liikide isendeid) on võimalik kasvatada suurtes plastkastides (näiteks 30 × 60 × 10 cm või 20 × 12 × 8 cm, mis on sobivad väikeste usside kasvukultuuri jaoks), mis on täidetud tehismulla ja müügil oleva ilma lisanditeta saastumata aiamalla seguga. Kompostmaterjali tuleks vältida, kuna see võib sisaldada mürgiseid kemikaale, nagu raskmetalle. Fauna tuleks kasvumullast enne kasutamist kolmekordse sügavkülmutamise teel eemaldada. Võib kasutada ka puhast tehismulda, aga paljunemiskiirus selles võib segatud substraatidega võrreldes olla väiksem. Substraadi pH peaks olema 6,0 ± 0,5. Kultuuri hoitakse ilma valguseta inkubaatoris temperatuuril 15 ± 2 °C. Igal juhul tuleks vältida kõrgema temperatuuri kui 23 °C kasutamist. Tehismuld / looduslik muld peaks olema niiske, aga mitte märg. Kui mulda käega õrnalt vajutatakse, peaksid ilmuma ainult väikesed veepiisad. Igal juhul tuleks vältida hapnikuvaegust (näiteks kaane kasutamisel peaks kaane aukude arv olema piisavalt suur, et tagada piisav õhuvahetus). Kasvumulda tuleks kord nädalas hoolika segamisega aereerida.

▼ **M4**

Usse tuleks vähemalt korra nädalas valitud ajal sööta valtsitud kaeraga, mis asetatakse mulda tehtud auku ja kaetakse mullaga. Kui mahutisse jääb eelmisest söötmise kuupäevast sööta, tuleks antava sööda kogust sellele vastavalt kohandada. Kui allesolevale söödale kasvavad seened, tuleks see asendada valtsitud kaera uue kogusega. Paljunemise stimuleerimiseks võib valtsitud kaera täiendada iga kahe nädala tagant müügil oleva vitamiinidega täiendatud valgupulbriga. Kolme kuu möödumisel kantakse loomad üle värskest valmistatud kultuuri või kasvusubstraati. Valtsitud kaer, mida tuleb säilitada suletud nõudes, tuleks enne kasutamist aidalestade (näiteks *Glyzyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) või röövlestadega (näiteks *Hypoaspis (Cosmolaelaps) miles*, *Gamasida*, *Acarina*) saastumise vältimiseks autoklaavida või läbi kuumutada. Pärast desinfitseerimist jahvatatakse sööt nii, et seda oleks lihtne mulla pinnale puistata. Muud võimalikud söödaallikad on pagaripärm või kalasööt TetraMin®.

Üldjoontes on kasvukultuuri tingimused piisavalt head, kui ussid ei proovi substraadist lahkuda, liiguvad mullas kiiresti, nende välispind on läikiv ilma selle külge jäänud mullaosakesteta, ussid on üldjoontes valkja värvusega ja kui näha on erinevas vanuses usse. Tegelikult saab usse pidada terveks, kui nad pidevalt paljunevad.

Täiendavad valitud viited

Achazi RK, Fröhlich E, Henneken M, Pilz C (1999). The effect of soil from former irrigation fields and of sewage sludge on dispersal activity and colonizing success of the annelid *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta). Newsletter on Enchytraeidae 6: 117–126.

Jänsch S, Amorim MJB, Römbke J (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. Environ. Reviews 13: 51–83.

Kuperman RG, Checkai RT, Simini M, Phillips CT, Kolakowski JE, Kurnas CW, Sunahara GI (2003). Survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Enchytraeidae) in a natural sandy loam soil amended with the nitro-heterocyclic explosives RDX and HMX. Pedobiologia 47: 651–656.

Römbke J (2003). Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: A review. Pedobiologia 47: 607–616.

Westheide W and Graefe U (1992). Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). J. Nat. Hist. 26: 479–488.

Westheide W and Müller MC (1996). Cinematographic documentation of enchytraeid morphology and reproductive biology. Hydrobiologia 334: 263–267.