

II

(Nelegislatīvi akti)

REGULAS

KOMISIJAS REGULA (ES) Nr. 260/2014

(2014. gada 24. janvāris),

ar kuru, pielāgojot tehnikas attīstībai, groza Regulu (EK) Nr. 440/2008 par testēšanas metožu noteikšanu saskaņā ar Eiropas Parlamenta un Padomes Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH)

(Dokuments attiecas uz EEZ)

EIROPAS KOMISIJA,

ņemot vērā Līgumu par Eiropas Savienības darbību,

mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību⁽³⁾ un Padomes 1986. gada 24. novembra Direktīva 86/609/EEK par dalībvalstu normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz to dzīvnieku aizsardzību, kurus izmanto izmēģinājumos un citiem zinātniskiem mērķiem⁽⁴⁾.

ņemot vērā Eiropas Parlamenta un Padomes 2006. gada 18. decembra Regulu (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH) un ar kuru izveido Eiropas Ķīmikāliju aģentūru, groza Direktīvu 1999/45/EK un atceļ Padomes Regulu (EEK) Nr. 793/93 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 1488/94, kā arī Padomes Direktīvu 76/769/EEK un Komisijas Direktīvu 91/155/EEK, Direktīvu 93/67/EEK, Direktīvu 93/105/EK un Direktīvu 2000/21/EK⁽¹⁾, un jo īpaši tās 13. panta 3. punktu,

tā kā:

(1) Komisijas Regulā (EK) Nr. 440/2008⁽²⁾ ir noteiktas Regulas (EK) Nr. 1907/2006 piemērošanai izmantojamās testēšanas metodes vielu fizikāli ķīmisko īpašību, toksicitātes un ekotoksicitātes noteikšanai.

(2) Jāatjaunina Regula (EK) Nr. 440/2008, tajā kā prioritāras iekļaujot jaunas un atjauninātas alternatīvas testēšanas metodes, kuras nesen pieņēmusi ESAO, lai panāktu izmēģinājumu dzīvnieku skaita samazināšanu, kā to paredz Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīva 2010/63/ES par zinātniskiem

(3) Pielāgošana ietver divas fizikāli ķīmisko īpašību noteikšanas metodes, proti, atjauninātu metodi, ar ko testē šķīdību ūdenī, un jaunu sadalījuma koeficienta testa metodi vielas noturīguma, bioakumulācijas un toksiskuma (PBT) īpašību novērtēšanai; četras jaunas un vienu atjauninātu metodi, ar ko nosaka ekotoksicitāti un vielas pārvērtības un īpašības vidē; deviņas metodes, ar ko nosaka vielas toksicitāti un citas veselību ietekmējošas īpašības: četras testēšanas metodes, ar ko nosaka vielas "toksiskumu ielūpojojot", proti, trīs atjauninātas metodes un viena jauna metode, kas palīdz samazināt izmantoto dzīvnieku skaitu un uzlabot ietekmes novērtēšanu; atjaunināta 28 dienu atkārtotās devas orālās toksicitātes testēšanas metode, kura papildināta ar endokrīnās aktivitātes novērtēšanas parametriem; atjaunināta toksikokinētiskās testēšanas metode toksikoloģisko pētījumu sagatavošanas un veikšanas vajadzībām; atjauninātas metodes, ar ko nosaka hronisku toksicitāti vai kancerogenitāti, vai hronisku toksicitāti un kancerogenitāti vienlaicīgi.

(4) Tāpēc attiecīgi būtu jāgroza Regula (EK) Nr. 440/2008.

(5) Šajā regulā paredzētie pasākumi ir saskaņā ar atzinumu, ko sniegusi komiteja, kura izveidota saskaņā ar Regulas (EK) Nr. 1907/2006 133. pantu,

⁽¹⁾ OV L 396, 30.12.2006., 1. lpp.

⁽²⁾ OV L 142, 31.5.2008., 1. lpp.

⁽³⁾ OV L 276, 20.10.2010., 33. lpp.

⁽⁴⁾ OV L 358, 18.12.1986., 1. lpp.

IR PIEŅĒMUSI ŠO REGULU.

1. pants

Regulas (EK) Nr. 440/2008 pielikumu groza saskaņā ar šīs regulas pielikumu.

2. pants

Šī regula stājas spēkā trešajā dienā pēc tās publicēšanas *Eiropas Savienības Oficiālajā Vēstnesī*.

Šī regula uzliek saistības kopumā un ir tieši piemērojama visās dalībvalstīs.

Briselē, 2014. gada 24. janvārī

Komisijas vārdā –
priekšsēdētājs
José Manuel BARROSO

PIELIKUMS

Regulas (EK) Nr. 440/2008 pielikumu groza šādi:

- 1) pielikuma A.6. nodaļu aizstāj ar šādu:

“A.6. ŠĶĪDĪBA ŪDENĪ

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga Ekonomiskās sadarbības un attīstības organizācijas (ESAO) Testēšanas norādījumiem 105 (TG) (1995. gads). Šī testēšanas metode ir sākotnējo 1981. gadā pieņemto TG 105 pārskatīta versija. Nav būtiskas atšķirības starp pašreizējo versiju un 1981. gada versiju. Galvenokārt ir mainīta forma. Pārskatīšanas pamatā bija ES testēšanas metode “Šķīdība ūdenī” ⁽¹⁾.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

2. Vielās šķīdību ūdenī var būtiski ietekmēt piemaisījumi. Ar šo testēšanas metodi nosaka praktiski tīru, ūdenī stabilu un negaistošu vielu šķīdību ūdenī. Pirms noteikt šķīdību ūdenī, ir lietderīgi iegūt provizorisku informāciju par testējamo vielu, piemēram, par struktūrformulu, tvaika spiedienu, disociācijas konstanti un hidrolīzi atkarībā no pH līmeņa.
3. Šīs testēšanas metožu apraksts aptver divas metodes, proti, kolonnas eluēšanas metodi un kolbas metodi, kas attiecas uz šķīdību, kura ir attiecīgi mazāka un lielāka par 10^{-2} g/l. Ir aprakstīts arī vienkāršots provizorisks tests. Tajā var aptuveni noteikt, kādam jābūt galīgajā testā izmantotā parauga apjomam un cik daudz laika vajag, lai sasniegtu piesātinājumu.

DEFINĪCIJAS UN MĒRVENĪBAS

4. Vielās šķīdība ūdenī ir vielas piesātinājuma masas koncentrācija ūdenī attiecīgajā temperatūrā.
5. Šķīdību ūdenī izsaka ar izšķīdušās vielas masu uz vienu šķīduma tilpuma vienību. SI mērvienība ir kg/m^3 , bet var izmantot arī g/l.

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

6. Pētot testējamo vielu, nav vajadzības izmantot ķīmiskās standartvielas.

METOŽU APRAKSTS

Testēšanas apstākļi

7. Testu vēlamā veikšana ir $20 \pm 0,5$ °C temperatūrā. Izraudzītā temperatūra pastāvīgi jāuztur visās attiecīgajās iekārtas daļās.

Provizoriskais tests

8. Aptuveni 0,1 gramam parauga (cietas testējamās vielas ir jāsaberž pulverī) 10 ml mērcilindrā ar stikla aizbāzni pakāpeniski pieaugošā daudzumā pievieno ūdeni istabas temperatūrā. Pēc katras kāda ūdens daudzuma pievienošanas maisījumu 10 minūtes krata un vizuāli pārbauda, vai tajā vēl ir neizšķīdušas parauga daļiņas. Ja pēc 10 ml ūdens pievienošanas viss paraugs vai tā daļas nav izšķīdušas, noteikšanu atkārtoti 100 ml mērcilindrā. Aptuvenā šķīdība ir norādīta 1. tabulā zem pievienotā ūdens daudzuma, kurā notiek parauga pilnīga izšķīšana. Testējamām vielām ar zemu šķīdību pilnīgai izšķīšanai var būt vajadzīgs ilgs laiks un būtu jāļauj šķīst vismaz 24 stundas. Ja pēc 24 stundām viela joprojām nav izšķīdusi, būtu jāļauj šķīst ilgāku laiku (līdz 96 stundām) vai jāturpina atšķaidīšana, lai noskaidrotu, vai šķīdības noteikšanu vēlamā veikt pēc kolonnas eluēšanas metodes vai kolbas metodes.

1. tabula

ml ūdens uz 0,1 g šķīdināmās vielas izšķīšanai	0,1	0,5	1	2	10	100	> 100
Aptuvenā šķīdība g/l	> 1 000	1 000 līdz 200	200 līdz 100	100 līdz 50	50 līdz 10	10 līdz 1	< 1

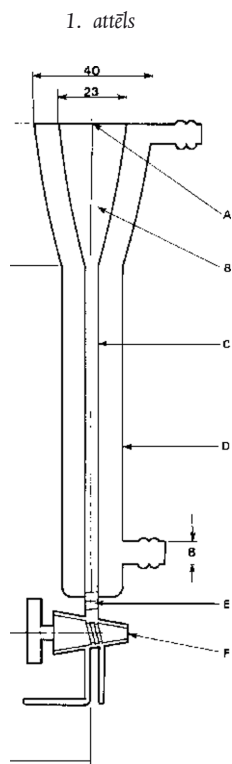
Kolonnas eluēšanas metode

Metodes princips

9. Šīs metodes pamatā ir testējamās vielas eluēšana ar ūdeni no mikrokolonnas, kurā ir inerts nesējs, kas iepriekš ir bagātīgi pārklāts ar testējamo vielu (2). Šķīdību ūdenī izsaka kā eluāta masas koncentrāciju brīdī, kad šī koncentrācija kā laika funkcija ir sasniegusi plato.

Iekārta

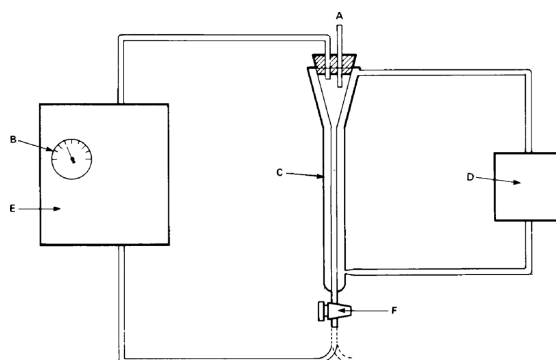
10. Iekārta sastāv no mikrokolonnas (1. attēls), ko uztur nemainīgā temperatūrā. Tā ir savienota vai nu ar recirkulācijas sūkni (2. attēls), vai ar spiediena izlīdzināšanas trauku (3. attēls). Mikrokolonnā ir inerts nesējs, ko vietā notur neliels stikla vates tampons, kurš vienlaikus aiztur neizšķīdušās daļiņas. Par nesēju var izmantot, piemēram, stikla lodītes, irdeno diatomītu vai citus inertus materiālus.
11. Turpmāk 1. attēlā parādītā mikrokolonna ir piemērota recirkulācijas sūkņa uzstādīšanai. Tai ir brīvais tilpums, kurā ietilpst pieci slāņa tilpumi (no kuriem testa sākumā atbrīvojas) un piecu paraugu tilpums (ko testa laikā atvelk analīzes veikšanai). Pastāv arī iespēja izmērus samazināt, ja testa laikā sistēmai var pievienot ūdeni, ar ko aizvieto sākotnējos piecus slāņa tilpumus, kuri tikuši izvadīti kopā ar piemaisījumiem. Ar inerta materiāla caurulīti kolonna ir pievienota recirkulācijas sūknim, ar kuru var piegādāt aptuveni 25 ml/h. Par recirkulācijas sūkni var izmantot, piemēram, peristaltisko sūkni vai membrānas sūkni. Jāizvairās no piesārņošanas ar caurulīšu materiālu un/vai attiecīgas adsorbcijas.
12. Turpmāk 3. attēlā ir parādīta shematiskā sistēma, kurā izmantots spiediena izlīdzināšanas trauks. Šajā sistēmā mikrokolonna ir aprīkota ar vienvirziena krānu. Spiediena izlīdzināšanas trauks ir pievienots ar pieslīpēta stikla savienojumu un inerta materiāla caurulīti. Spiediena izlīdzināšanas traukā ieteicams izmantot plūsmas ātrumu aptuveni 25 ml/h.



Izmēri milimetros

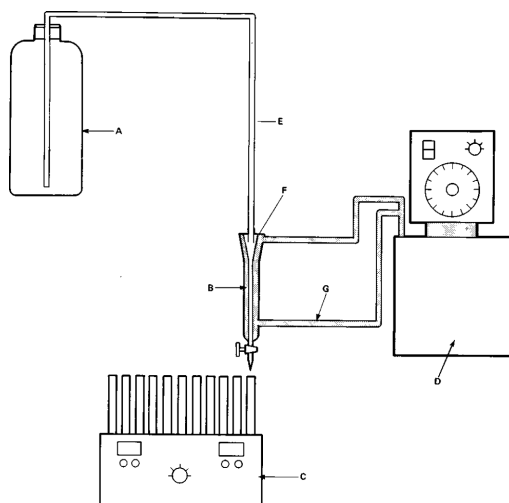
- A. Vieta slīpēta stikla savienojumam
- B. Brīvais tilpums
- C. Iekšējais diametrs – 5
- D. Ārējais diametrs – 19
- E. Stikla vates tampons
- F. Krāns

2. attēls



- A. Gaisa caurule
- B. Plūsmas mērītājs
- C. Mikrokolonna
- D. Termostatējams cirkulācijas sūknis
- E. Recirkulācijas sūknis
- F. Divkanālu ventis paraugu ņemšanai

3. attēls



- A. Spiediena izlīdzināšanas trauks (piemēram, 2,5 litru ķīmisko vielu kolba)
- B. Kolonna
- C. Frakciju ievācējs
- D. Termostats
- E. Teflona caurule
- F. Slīpēta stikla savienojums
- G. Ūdenslīnija (starp termostatu un kolonnu, iekšējais diametrs ir aptuveni 8 mm)

13. Apaļkolbā (50 ml) ievieto aptuveni 600 mg nesējmateriāla. Vajadzīgo testējamās vielas daudzumu izšķīdina analītiski tīrā gaistošā šķīdinātājā, un attiecīgu šā šķīduma daudzumu pievieno nesējam. Šķīdinātāju pilnībā iztvaicē, piemēram, izmantojot rotācijas ietvaicētāju, tāpēc ka pretējā gadījumā eluēšanas laikā netiek panākta nesēja piesātināšanās ar ūdeni, jo notiek sadalīšanās uz virsmas. Sagatavoto nesējmateriālu divas stundas mērcē aptuveni 5 ml ūdens un suspensiju iepilda mikrokolonnā. Var arī sausu sagatavotu nesējmateriālu iebērt mikrokolonnā, kurā iepildīts ūdens, un divas stundas nostādīt.

14. Nesējmateriāla uzpildīšana var radīt problēmas, tādēļ iegūtie rezultāti var būt kļūdaini, piemēram, ja testējamā viela elļveidīgi nogulsņējas. Šādas problēmas jāizskata, un rezultāti jāatspoguļo ziņojumā.

Procedūra ar recirkulācijas sūkni

15. Caur kolonnu sāk laist plūsmu. Tās ieteicamais ātrums ir apmēram 25 ml/h, kas atbilst aprakstītās kolonnas 10 slāņa tilpumiem stundā. Vismaz no pieciem pirmajiem slāņa tilpumiem atbrīvojas, lai atdalītu ūdenī šķīstošos piemaisījumus. Tad iedarbina sūkni, līdz iestājas līdzsvars, par ko liecina pieci secīgi paraugi, kuru koncentrācijas nejaušās atšķirības nepārsniedz $\pm 30\%$. Šos paraugus ņem ar tādu laika intervālu, kurā izplūstošais daudzums atbilst vismaz 10 kolonnas slāņa tilpumiem. Atkarībā no izmantotās analītiskās metodes var būt vēlams izveidot koncentrācijas/laika likni, pēc kuras varētu pārlielināties, ka ir sasniegts līdzsvars.

Procedūra ar spiediena izlīdzināšanas trauku

16. Pēc secīgu eluāta frakciju ievākšanas tās analizē, izmantojot izraudzīto metodi. Šķīdības noteikšanai izmanto eluāta vidējās frakcijas, kurās vielas koncentrācija vismaz piecās secīgās frakcijās nemainīgi ir $\pm 30\%$.
17. Ieteicamais eluents ir bidestilēts ūdens. Var izmantot arī dejonizētu ūdeni ar pretestību vairāk nekā 10 megaomi uz centimetru un kopējo organiskā oglekļa saturu zem 0,01 %.
18. Abās procedūrās otro sēriju veic ar plūsmas ātrumu, kas ir uz pusi mazāks par pirmās sērijas plūsmas ātrumu. Ja pēc abām sērijām iegūtie rezultāti sakrīt, uzskata, ka noteikšanas rezultāti ir apmierinoši. Ja ar mazāku plūsmas ātrumu noteiktā šķīdība ir lielāka, tad plūsmas ātrums divkārt jāsamazina tik ilgi, kamēr pēc divām secīgām sērijām iegūtie šķīdības rezultāti sakrīt.
19. Abos gadījumos jāpārbauda, vai frakcijas nesatur koloidus, par ko liecina Tindala efekts. Šādu daļiņu klātbūtne padara rezultātus neizmantojamus, un noteikšana jāatkārto pēc kolonnas filtrācijas spējas uzlabošanas.
20. Jānosaka katra parauga pH līmenis, vēlams, izmantojot speciālas indikatorstrēmeles.

Kolbas metode

Metodes princips

21. Testējamo vielu (cietvielas ir jāsaaberž pulverī) izšķīdina ūdenī temperatūrā, kas nedaudz pārsniedz temperatūru, kuru izmanto noteikšanai. Kad ir panākta piesātināšanās, maisījumu atdzesē un glabā tādā temperatūrā, kādā tiks veikta noteikšana. Vai arī, ja pienācīga paraugu ņemšanas programma liecina, ka ir sasniegts piesātinājuma līdzsvars, mērījumu (noteikšanas temperatūrā) var veikt nekavējoties. Pēc tam ar piemērotu analītisko metodi (3) nosaka testējamās vielas masas koncentrāciju ūdens šķīdumā, kas nedrīkst saturēt neizšķīdušas daļiņas.

Iekārta

22. Ir vajadzīgi šādi materiāli:

- parastie laboratorijas trauki un mēraparāti,
- ierīce, kas piemērota šķīdumu kustināšanai nemainīgā regulējamā temperatūrā,
- centrifūga (vēlams, termostatējama), ja vajadzīga emulsijām, un
- analītiskais aprīkojums.

Procedūra

23. Vispirms provizorisks testē nosaka, kāds testējamās vielas daudzums nepieciešams vajadzīgā ūdens tilpuma piesātināšanai. Katrā no trijiem stikla traukiem ar stikla aizbāzni (piemēram, centrifūgas mēģenēs vai kolbās) iesver apmēram piecreiz lielāku minēto vielas daudzumu. Katrā traukā pievieno tik ūdens, cik vajadzīgs atkarībā no analītiskās metodes un šķīdības diapazona. Pēc tam traukus cieši noslēdz un saturu kustina 30 °C temperatūrā. Jāizmanto kratītājs vai maisītājs, kas var darboties nemainīgā temperatūrā, piemēram, jāmais ar magnētisko maisītāju termostatējamā ūdens vannā. Pēc vienas dienas vienu no traukiem 24 stundas testēšanas temperatūrā nostādina, to periodiski sakratot. Pēc tam trauka saturu centrifugē testēšanas temperatūrā un ar piemērotu analītisko metodi nosaka testējamās vielas koncentrāciju dzidrā ūdens fāzē. Pēc attiecīgas divu un triju dienu nostādīšanās 30 °C temperatūrā tāpat rīkojas ar pārējām divām kolbām. Ja vismaz divos pēdējos traukos

noteiktās koncentrācijas neatšķiras vairāk kā par 15 %, uzskata, ka tests ir izdevies. Ja ar pirmo, otro un trešo trauku iegūto rezultātu vērtībai ir tendence paaugstināties, tests pilnībā jāatkārto, izmantojot ilgāku nostādīšanas laiku.

24. Testu var veikt arī bez iepriekšējas inkubēšanas 30 °C temperatūrā. Lai noteiktu, cik ātri iestājas piesātinājuma līdzsvars, paraugus ņem līdz brīdim, kamēr maisīšanas ilgums vairs neietekmē noteikto koncentrāciju.
25. Jānosaka katra parauga pH līmenis, vēlams, izmantojot īpašas indikatorstrēmeles.

Analītiskā noteikšana

26. Ir ieteicams izmantot metodi, kas piemērota konkrētai vielai, jo pat neliels daudzums šķīstošu piemaisījumu šķīdības mērījumu rezultātos var radīt nopietnas kļūdas. Šādu metožu piemēri ir gāzhromatogrāfija vai šķīdumhromatogrāfija, titrēšana, fotometrija un voltometrija.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

Kolonnas eluēšanas metode

27. Katrā sērijā jāaprēķina vidējā vērtība un standartnovirze, izmantojot vismaz piecus secīgus piesātinājuma plato fāzē ņemtus paraugus. Vidējās vērtības, kas iegūtas divos testos ar dažādām plūsmām, nedrīkst atšķirties vairāk kā par 30 %.

Kolbas metode

28. Aprēķina vidējo vērtību no visu triju kolbu atsevišķajiem rezultātiem, kas nedrīkst atšķirties vairāk kā par 15 %.

Testēšanas pārskats

Kolonnas eluēšanas metode

29. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

- provizoriskā testa rezultāti,
- ķīmiskā identitāte un piemaisījumi (iepriekšēja attīrīšana, ja tiek veikta),
- katram paraugam noteiktās koncentrācijas, plūsmas ātrumi un pH,
- vidējās vērtības un standartnovirzes, kas katrā sērijā noteiktas vismaz pieciem paraugiem, kuri ņemti piesātinājuma plato fāzē,
- vismaz divu secīgu sēriju vidējā vērtība,
- ūdens temperatūra piesātināšanas procesa laikā,
- izmantotā analīzes metode,
- nesējmateriāls,
- nesējmateriāla uzpildīšana,
- izmantotais šķīdinātājs,
- liecības par vielas ķīmisko nestabilitāti testa laikā,
- visa informācija, kas vajadzīga rezultātu interpretēšanai, it sevišķi par piemaisījumiem un testējamās vielas agregātstāvokli.

Kolbas metode

30. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

- provizoriskā testa rezultāti,
- ķīmiskā identitāte un piemaisījumi (iepriekšēja attīrīšana, ja tiek veikta),

- atsevišķo analītisko noteikšanu rezultāti un vidējās vērtības gadījumos, kad vienai kolbai noteikta vairāk nekā viena vērtība,
- katra parauga pH,
- no vairākām kolbām iegūto sakrītošo rezultātu vidējā vērtība,
- testēšanas temperatūra,
- analītiskā metode,
- liecības par vielas ķīmisko nestabilitāti testa laikā,
- visa informācija, kas vajadzīga rezultātu interpretēšanai, it sevišķi par piemaisījumiem un testējamās vielas agregātstāvokli.

LITERATŪRA

- (1) Komisijas 1992. gada 31. jūlija Direktīva 92/69/EEK, ar ko septiņpadsmito reizi tehnikas attīstībai pielāgo Padomes Direktīvu 67/548/EEK par normatīvo un administratīvo aktu tuvināšanu attiecībā uz bīstamu vielu klasifikāciju, iepakojšanu un marķēšanu (OV L 383, 29.12.1992., 54. lpp.).
 - (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.”;
- 2) pievieno šādu A.23. nodaļu:

“A.23. SADALĪJUMA KOEFICIENTS (1-OKTANOLS/ŪDENS): LĒNĀS MAISIŠANAS METODE

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 123 (TG) (2006). 1-oktanola/ūdens sadalījuma koeficienta (P_{OW}) vērtības līdz $\log P_{OW} 8,2$ ir precīzi noteiktas ar lēnās maisīšanas metodi (1). Tāpēc šī eksperimentālā pieeja ir piemērota izteikti hidrofobisku vielu P_{OW} tiešai noteikšanai.
2. Citas metodes 1-oktanola/ūdens sadalījuma koeficienta (P_{OW}) noteikšanai ir “kolbu kratīšanas metode” (2) un P_{OW} noteikšana pēc apgrieztās fāzes HPLC aiztures dinamikas (3). “Kolbu kratīšanas metode” mēdz radīt artefaktus, un tā cēlonis ir oktanola mikropilienu nonākšana ūdens fāzē. Ja P_{OW} vērtības palielinās, šo pilienu klātbūtne ūdens fāzē noved pie tā, ka testējamās vielas koncentrācija ūdenī aizvien vairāk tiek novērtēta par augstu. Tāpēc to var izmantot tikai vielām ar $\log P_{OW} < 4$. Ar otro metodi, izmantojot stabilus datus par tieši noteiktām P_{OW} vērtībām, kalibrē sakarību starp HPLC aiztures dinamiku un noteiktajām P_{OW} vērtībām. Agrāk projekta veidā bija pieejami ESAO norādījumi par jonizējamu vielu 1-oktanola/ūdens sadalījuma koeficientu noteikšanu (4), bet tos vairs neizmanto.
3. Šī testēšanas metode ir izstrādāta Nīderlandē. Šeit aprakstīto metožu precizitāte ir validēta un optimizēta ar starplaboratoriju salīdzinošu testēšanu veiktā validējošā pētījumā, kurā piedalījās 15 laboratorijas (5).

SĀKOTNĒJI APSVĒRUMI

Nozīme un izmantošana

4. Inertām organiskajām vielām ir konstatētas ļoti būtiskas sakarības starp 1-oktanola/ūdens sadalījuma koeficientiem (P_{OW}) un šo vielu bioakumulāciju zivīm. Turklāt ir pierādīts, ka P_{OW} korelē ar toksiskumu zivīm, kā arī ar ķīmisko vielu sorbciju uz tādām cietvielām kā augsne un nogulumieži. Plašs pārskats par šīm sakarībām sniegts norādītajā avotā (6).

5. Ir konstatēts daudz dažādu sakarību starp 1-oktanolā/ūdens sadalījuma koeficientu un citām vielu īpašībām, kas attiecas uz vides toksikoloģiju un ķīmiju. Rezultātā 1-oktanolā/ūdens sadalījuma koeficients ir kļuvis par vienu no galvenajiem parametriem, novērtējot ķīmisko vielu radīto risku videi, kā arī prognozējot ķīmisko vielu apriti vidē.

Tvērums

6. Uzskata, ka lēnās maisīšanas eksperimentā no 1-oktanolā pilieniem ūdens fāzē mazāk veidojas mikropilieni. Tas novērš ietekmi, ko rada testējamās vielas molekulu piesaistīšanās šādiem pilieniem, un attiecīgi ūdens koncentrācija netiek novērtēta pārāk augstu. Tāpēc lēnās maisīšanas metode ir īpaši piemērota P_{OW} noteikšanai vielām, kuru paredzamā $\log P_{OW}$ vērtība ir 5 un augstāka un kurām "kolbu kratīšanas metode" (2) var sniegt kļūdainus rezultātus.

DEFINĪCIJAS UN MĒRVIENTĪBAS

7. Vielas sadalījuma koeficients starp ūdeni un lipofilu šķīdinātāju (1-oktanolu) raksturo ķīmiskās vielas līdzsvara sadalījumu starp abām fāzēm. Sadalījuma koeficientu starp ūdeni un 1-oktanolu (P_{OW}) definē kā attiecību starp divām testējamās vielas līdzsvara koncentrācijām – ar ūdeni piesātinātā 1-oktanolā (C_O) un ar 1-oktanolu piesātinātā ūdenī (C_W).

$$P_{OW} = C_O/C_W$$

Kā koncentrāciju attiecība šis koeficients ir bezdimensijas lielums. Visbiežāk to izsaka kā decimāllogaritmu ($\log P_{OW}$). P_{OW} ir atkarīgs no temperatūras, un ziņojumā ietvertajos datos ir jānorāda temperatūra mērījumu laikā.

METODES PRINCIPS

8. Lai noteiktu sadalījuma koeficientu, ūdenim, 1-oktanolam un testējamajai vielai ļauj sasniegt savstarpēja līdzsvara stāvokli nemainīgā temperatūrā. Pēc tam nosaka testējamās vielas koncentrāciju abās fāzēs.
9. Eksperimentālās grūtības, kas kolbu kratīšanas testā saistītas ar mikropilienu veidošanos, var samazināt ar šeit ieteikto lēnās maisīšanas testu. Lēnās maisīšanas testā ūdenim, 1-oktanolam un testējamajai vielai ļauj nostāvēties termostatējamā reaktorā ar maisītāju. Apmaiņu starp fāzēm paātrina ar maisīšanu. Ar maisīšanu tiek nodrošināta neliela turbulence, kas uzlabo 1-oktanolā un ūdens apmaiņu, novēršot mikropilienu veidošanos (1).

TESTA PIEMĒROJAMĪBA

10. Tā kā citu vielu klātbūtne varētu ietekmēt testējamās vielas aktivitātes koeficientu, testējamā viela ir jātestē kā tīra viela. 1-oktanolā/ūdens sadalījuma testā ir jāizmanto viela ar tirdzniecībā pieejamo augstāko tīrību.
11. Šī metode piemērojama tīrām vielām, kas nedisociējas vai neasociējas un kam nepiemīt būtiska starpfāžu aktivitāte. To var izmantot, lai noteiktu šādu vielu un maisījumu 1-oktanolā/ūdens sadalījuma attiecību. Ja metodi izmanto maisījumiem, noteiktās 1-oktanolā/ūdens sadalījuma attiecības ir atkarīgas no testējamā maisījuma ķīmiskā sastāva un no izmantotās ūdens fāzes elektrolītu sastāva. Ar nosacījumu, ka tiek veikti papildu pasākumi, metodi var piemērot arī savienojumiem, kas disociējas vai asociējas (12. punkts).
12. Tā kā ūdenī un 1-oktanolā, kas iesaistīti disociējošos vielu (piemēram, organisko skābju un fenolu, organisko bāzu un metālorganisko vielu) 1-oktanolā/ūdens sadalījumā, ir vairāki sadalījuma līdzsvari, 1-oktanolā/ūdens sadalījuma attiecība ir nosacījuma konstante, kura ir lielā mērā atkarīga no elektrolītu sastāva (7) (8). Tāpēc 1-oktanolā/ūdens sadalījuma attiecības noteikšanai ir vajadzīgs, lai pH un elektrolītu sastāvs testā tiktu regulēts un arī norādīts ziņojumā. Šo sadalījuma attiecību izvērtēšanā jāizmanto ekspertu atzinumi. Izmantojot disociācijas konstantes(-šu) vērtību, jāizraugās tādas piemērotas pH vērtības, lai sadalījuma attiecība tiktu noteikta katram jonizācijas stāvoklim. Testējot metālorganiskos savienojumus, jāizmanto buferšķīdumi, kas nav kompleksveidotāji (8). Nemot vērā esošās zināšanas par ūdens ķīmiju (kompleksu veidošanās konstantēm, disociācijas konstantēm), jāizraugās tādi eksperimenta apstākļi, lai varētu aprēķināt testējamās vielas sastāvu ūdens fāzē. Visos eksperimentos jābūt vienādam jonu spēkam, ko panāk, izmantojot fona elektrolītu.
13. Sarežģījumi testā var rasties, ja tiek testētas vielas ar zemu šķīdību ūdenī vai augstu P_{OW} , jo tādā gadījumā koncentrācijas ūdenī ir ļoti zemas un ir grūti tās precīzi noteikt. Šī testēšanas metode sniedz norādījumus, kā risināt šo problēmu.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

14. Ķīmiskajiem reaģentiem jābūt analītiski tīriem vai vēl tīrākiem. Ieteicams lietot neiezīmētas testējamās vielas ar zināmu ķīmisko sastāvu un, vēlams, vismaz 99 % tīrību vai radioaktīvi iezīmētas testējamās vielas ar zināmu ķīmisko sastāvu un radioķīmisko tīrību. Ja iezīmēšanai izmantoti izotopi ar īsu pussabrukšanas periodu, dati attiecīgi jākorrigē. Ja iezīmēšanai izmantoti izotopi ar īsu pussabrukšanas periodu, jāveic attiecīga korekcija. Izmantojot iezīmētas testējamās vielas, jāizmanto attiecīgajai ķīmiskajai vielai specifiska analītiskā metode, lai nodrošinātu, ka izmērītā radioaktivitāte ir tieši saistīta ar testējamo vielu.
15. Log P_{OW} vērtību var aptuveni aprēķināt ar komerciāli pieejamu programmatūru log P_{OW} aplēšanai vai arī pēc attiecības starp vielas šķīdību vienā un otrā šķīdinātājā.
16. Pirms veic lēnās maisīšanas eksperimentu, lai noteiktu P_{OW} , par testējamo vielu jābūt pieejamai šādai informācijai:
- a) struktūrformula;
 - b) piemērotas analītiskās metodes, ar ko var noteikt vielas koncentrāciju ūdenī un 1-oktanolā;
 - c) jonizējamo vielu disociācijas konstante(-es) (ESAO norādījumi 112 (9));
 - d) šķīdība ūdenī (10);
 - e) abiotiskā hidrolīze (11);
 - f) pilnīgā bionoārdāmība (12);
 - g) tvaika spiediens (13).

METODES APRAKSTS

Aprīkojums un aparātūra

17. Vajadzīgs laboratorijas standartaprīkojums, it sevišķi šāds:

- ūdens fāzes maisīšanai izmantojamie magnētiskie maisītāji un ar teflonu pārklātie magnētiskie maisīšanas stienīši,
- analītiskie instrumenti, kas piemēroti testējamās vielas koncentrācijas noteikšanai prognozētajās koncentrācijās,
- maisīšanas trauks ar krānu trauka apakšā; atkarībā no testējamā savienojuma log P_{OW} aplēsēm un kvalitatīvās noteikšanas robežas (LOD) jāapsver, vai, lai varētu iegūt ķīmiskajai ekstrakcijai un analīzei pietiekamu daudzumu ūdens, nav jāizmanto reakcijas trauks, kuram ir tāda pati ģeometriskā forma un kura tilpums ir virs viena litra; tad varēs iegūt augstākas vielu koncentrācijas ūdens ekstraktā un tālād drošākus analītiskās noteikšanas rezultātus; 1. papildinājumā sniegta tabula ar aplēsēm par minimālo vajadzīgo tilpumu, savienojuma LOD, tā log P_{OW} un tā šķīdību ūdenī; tabulas pamatā ir *Pinsuwan et al.* (14) sniegtā log P_{OW} sakarība ar attiecību starp šķīdību oktanolā un ūdenī:

$$\log P_{OW} = 0,88 \log SR + 0,41$$

kur:

$SR = S_{oct}/S_w$ (molārā koncentrācija),

un *Lyman* (15) sniegtā sakarība, pēc kuras prognozē šķīdību ūdenī; šķīdība ūdenī, kas aprēķināta pēc 1. papildinājumā dotā vienādojuma, jāuzskata par pirmo aplēsi; jāatzīmē, ka lietotājs šķīdību ūdenī var aplēst, brīvi izmantojot jebkādu sakarību, ja tiek uzskatīts, ka tā labāk atspoguļo sakarību starp hidrofobitāti un šķīdību; piemēram, cietiem savienojumiem šķīdības prognozēšanā ir ieteicams izmantot arī kušanas temperatūru; ja tiek izmantots pārveidots vienādojums, ir jāpārlicinās, ka vienādojums, pēc kura rēķina šķīdību oktanolā, joprojām ir derīgs; 2. papildinājumā ir dots shematisks zīmējums, kurā attēlots stikla apvalkā ievietots maisīšanas trauks ar aptuvenu tilpumu viens litrs; 2. papildinājumā attēlotā trauka izmēru attiecības ir izrādījušās ļoti ērtas un būtu jā saglabā arī tad, ja tiek izmantota citu izmēru aparātūra,

- būtiski ir tas, kādā veidā lēnās maisīšanas testā saglabā nemainīgu temperatūru.

18. Traukiem jābūt izgatavotiem no inerta materiāla, lai adsorbēcija uz trauku virsmām būtu niecīga.

Testējamo šķīdumu sagatavošana

19. P_{OW} jānoteic, izmantojot 1-oktanolu ar augstāko komerciāli pieejamo tīrību (vismaz + 99 %). 1-oktanolu ieteicams attīrīt, izmantojot ekstrakciju ar skābi, bāzi un ūdeni un pēc tam žāvēšanu. Papildus tam 1-oktanolā attīrīšanā var izmantot destilāciju. Testējamo vielu standartšķīdumu sagatavošanā ir jāizmanto attīrīts 1-oktanol. Ūdenim, ko izmanto P_{OW} noteikšanā, jābūt destilētam stikla vai kvarca aparātā vai iegūtam attīrīšanas sistēmā, vai arī var izmantot ūdeni ar HPLC klases tīrību. Destilēts ūdens ir jāfiltrē caur 0,22 μ m filtru, un ir jāizmanto arī tukšie paraugi, lai pārbaudītos, ka koncentrētajos ekstraktos nav piemaisījumu, kas varētu interferēt ar testējamo vielu. Ja izmanto stikla šķiedru filtru, tas jāsterilizē, vismaz trīs stundas to karsējot 400 °C temperatūrā.
20. Pirms eksperimenta abus šķīdinātājus savstarpēji piesātina, pietiekami lielā traukā tos līdzsvarojo. To izdara, divfāzu sistēmu divas dienas lēni maisot.
21. Attiecīgi izraugās testējamās vielas koncentrāciju, un vielu šādā koncentrācijā izšķīdina 1-oktanolā (kas piesātināts ar ūdeni). Vielas šķīdumiem 1-oktanolā un ūdenī jānosaka 1-oktanolā/ūdens sadalījuma koeficients. Tāpēc testējamās vielas koncentrācija nedrīkst pārsniegt 70 % no tās šķīdības ar maksimālo koncentrāciju 0,1 M jebkurā no fāzēm (1). 1-oktanolā šķīdumos, ko izmanto eksperimentā, nedrīkst būt neizšķīdušu suspendētu testējamās cietvielas daļiņu.
22. Attiecīgu testējamās vielas daudzumu izšķīdina 1-oktanolā (kas piesātināts ar ūdeni). Ja $\log P_{OW}$ aplēse pārsniedz 5, jāraugās, lai 1-oktanolā šķīdumos, ko izmanto eksperimentā, nebūtu suspendētu testējamās cietvielas daļiņu. Šajā nolūkā ar ķīmiskām vielām, kam aplēstā $\log P_{OW}$ vērtība ir > 5, rīkojas šādi:

- testējamo vielu izšķīdina 1-oktanolā (kas piesātināts ar ūdeni),
- šķīdumu nostādina, līdz suspensija nogulsņējas; nostādināšanas laikā seko testējamās vielas koncentrācijai,
- kad 1-oktanolā šķīdumā mērītās koncentrācijas ir stabilizējušās, pamatšķīdumu atšķaida ar attiecīgu daudzumu 1-oktanolā,
- izmēra atšķaidītā pamatšķīduma koncentrāciju; ja izmērītā koncentrācija atbilst atšķaidījumam, atšķaidīto pamatšķīdumu var izmantot noteikšanai pēc lēnās maisīšanas paņēmiena.

Paraugu ekstrakcija un analizēšana

23. Testējamās vielas analizēšanai jāizmanto validēta analītiskā metode. Pētniekiem jāsniedz dati, kas pierāda, ka koncentrācija gan ar ūdeni piesātinātā 1-oktanolā, gan arī ar 1-oktanolu piesātinātā ūdens fāzē testa laikā pārsniedz ar analītiskajās procedūrās izmantoto metodi saistīto kvantificēšanas robežu. Gadījumos, kuros nepieciešams izmantot ekstrakcijas metodes, pirms eksperimenta jānosaka testējamās vielas analītiskā atgūstamība no ūdens fāzes un no 1-oktanolā fāzes. Analītiskais signāls jākorrigē pēc tukšiem paraugiem un jāraugās, lai nenotiek analīta pārnese no parauga uz paraugu.
24. Pirms analīzes, visticamāk, būs jāveic ūdens fāzes ekstrakcija ar organisku šķīdinātāju, kā arī ekstrakta priekškoncentrēšana, jo hidroforām testējamām vielām ūdens fāzē ir samērā zema koncentrācija. Tā paša iemesla dēļ ir jāsamazina iespējamās koncentrācijas tukšajiem paraugiem. Šajā nolūkā ir jāizmanto šķīdinātāji ar augstu tīrību, vislabāk šķīdinātāji, kas paredzēti vielu atlieku analīzei. Turklāt, strādājot ar iepriekš rūpīgi sagatavotiem (piemēram, ar šķīdinātājiem mazgātiem vai augstā temperatūrā karsētiem) stikla priekšmetiem, vieglāk ir izvairīties no piesārņojuma izplatīšanās.
25. Gaidāmās $\log P_{OW}$ vērtības aplēsi var iegūt ar aplēšanas programmu vai pēc ekspertu vērtējuma. Ja šī vērtība ir augstāka par 6, rūpīgi jākontrolē korekcijas pēc tukšajiem paraugiem un analīta iespējamā pārnese. Tāpat, ja $\log P_{OW}$ aplēse pārsniedz 6, atgūstamības korigēšanā obligāti jāizmanto kāds surogātstandarts, lai varētu sasniegt augstus priekškoncentrēšanas koeficientus. Komerciāli pieejamas vairākas P_{OW} aplēšanas datorprogrammas⁽¹⁾, piemēram, *Clog P* (16), *KOWWIN* (17), *ProLogP* (18) un *ACD log P* (19). Aplēšanas pieeju apraksti atrodami avotos, kas norādīti atsaucēs (20–22).

⁽¹⁾ Šī informācija ir sniegta tikai lietotāju ērtībām. Ja iespējams pierādīt, ka tādas pašas rezultātus nodrošina kādas citas datorprogrammas, kas līdzvērtīgas minētajām, var izmantot arī tās.

26. To, kādās kvantificēšanas robežās (LOQ) iespējams noteikt testējamas vielas daudzumu 1-oktanolā un ūdenī, novērtē, izmantojot atzītas metodes. Ar metodi saistīto kvantificēšanas robežu aptuveni var noteikt kā to koncentrāciju ūdenī vai 1-oktanolā, kurai signāla un trokšņa attiecība ir 10. Jāizraugās piemērota ekstrakcijas un priekškoncentrēšanas metode, kā arī jānosaka analītiskā atgūstamība. Lai analītiskajā noteikšanā iegūtu vajadzīgā lieluma signālu, izraugās piemērotu priekškoncentrēšanas koeficientu.
27. Pamatojoties uz analītiskās metodes parametriem un gaidāmajām koncentrācijas vērtībām, aptuveni nosaka, cik liels paraugs vajadzīgs, lai precīzi noteiktu savienojuma koncentrāciju. Nedrīkst izmantot tādus ūdens paraugus, kas ir pārāk mazi, lai iegūtu pietiekamu analītisko signālu. Tāpat jāizvairās no pārāk lielu ūdens paraugu izmantošanas, jo tad ūdens varētu pietrūkt minimālajam nepieciešamajam analīžu skaitam ($n = 5$). 1. papildinājumā ir norādīts parauga minimālais tilpums atkarībā no trauka tilpuma, testējamās vielas LOD un testējamās vielas šķīdības.
28. Testējamo vielu kvantificē, mērījumu rezultātus salīdzinot ar attiecīgajam savienojumam atbilstošām kalibrēšanas līknēm. Iekavās aiz analizēto paraugu koncentrācijām jānorāda standartu koncentrācijas.
29. Tādu testējamo vielu šķīdumi, kurām $\log P_{OW}$ aplēse ir augstāka par 6, pirms ekstrakcijas jāpastiprina, tiem pievienojot surogātstandartu, lai reģistrētu zudumus, kas rodas ekstrakcijas un ūdens paraugu priekškoncentrēšanas laikā. Lai varētu precīzi korigēt atgūstamību, surogātstandartiem jābūt ar tādām pašām vai ļoti līdzīgām īpašībām kā testējamajai vielai. Šajā nolūkā vēlams izmantot ar stabiliem izotopiem iezīmētus attiecīgo vielu analogus (piemēram, deiterētus vai ar ^{13}C iezīmētus). Ja analogus, kas iezīmēti ar stabiliem izotopiem, t. i., ^{13}C vai 2H , nav iespējams izmantot, ar drošiem literatūras datiem jāparāda, ka surogātstandarta fizikālķīmiskās īpašības ir ļoti līdzīgas testējamās vielas īpašībām. Ūdens fāzes šķīduma-šķīduma ekstrakcijas laikā var veidoties emulsijas. Tās var samazināt, pievienojot sāli un līdz nākamajai dienai nostādinot. Ziņojumā jānorāda paraugu ekstrakcijai un priekškoncentrēšanai izmantotās metodes.
30. No 1-oktanolā fāzes iegūtos paraugus pirms analīzes, ja nepieciešams, var atšķaidīt ar piemērotu šķīdinātāju. Turklāt vielām, kurām konstatēta liela atgūstamības izkliede (relatīvā standartnovirze $> 10\%$), atgūstamības korekcijai ieteicams izmantot surogātstandartus.
31. Ziņojumā jāsniedz sīka informācija par izmantoto analītisko metodi. Tajā jāietver ziņas par ekstrakcijas metodi, priekškoncentrēšanas un atšķaidījuma koeficientiem, instrumentu parametriem, kalibrēšanas procesu, kalibrēšanas diapazonu, testējamās vielas analītisko atgūstamību no ūdens fāzes, atgūstamības korekcijai izmantotajiem surogātstandartiem, tukšo paraugu vērtībām, kā arī noteikšanas un kvantificēšanas robežām.

Testa veikšana

Optimālā 1-oktanolā/ūdens tilpuma attiecība

32. Izvēloties ūdens un 1-oktanolā tilpumus, jāņem vērā vielas LOQ 1-oktanolā un ūdenī, ūdens paraugiem izmantotie priekškoncentrēšanas koeficienti, ņemto 1-oktanolā un ūdens fāzes paraugu tilpumi, kā arī gaidāmās koncentrācijas. 1-oktanolā tilpums lēnās maisīšanas sistēmā eksperimentam jāizvēlas tāds, lai 1-oktanolā slānis būtu pietiekami biezs ($> 0,5$ cm) un lai 1-oktanolā fāzē paraugus varētu ņemt, to nesajaucot.
33. Parasti fāžu attiecība, ko izmanto, testējot savienojumus, kuriem $\log P_{OW}$ ir 4,5 un augstāks, ir 20 līdz 50 ml 1-oktanolā un 950 līdz 980 ml ūdens viena litra traukā.

Testēšanas apstākļi

34. Testēšanas laikā reakcijas trauku termostatē, temperatūras svārstības samazinot līdz mazāk nekā $1^\circ C$. Noteikšana jāveic $25^\circ C$ temperatūrā.
35. Eksperimentālā sistēma jāaizsargā no dienasgaismas, testēšanu izdarot tumšā telpā vai arī reakcijas trauku pārklājot ar alumīnija foliju.
36. Eksperiments jāveic no putekļiem tīrā vidē (ciktāl tas iespējams).
37. 1-oktanolā un ūdens sistēmu maisa, līdz iestāties līdzsvars. Ievadeksperimentā līdzsvarošanās perioda ilgumu novērtē, veicot lēnās maisīšanas eksperimentu, kurā periodiski ņem ūdens un 1-oktanolā paraugus. Starp paraugu ņemšanas reizēm jābūt vismaz piecām stundām.
38. Katru P_{OW} skaitlisko vērtību nosaka pēc vismaz triju neatkarīgu lēnās maisīšanas eksperimentu rezultātiem.

Līdzsvara iestāšanās laika noteikšana

39. Pieņem, ka līdzsvars ir sasniegts, kad 1-oktanola/ūdens koncentrāciju attiecības regresija pret laiku četros laika punktos veido līniju, kuras slīpums ar ticamības līmeni 0,05 būtiski neatšķiras no nulles. Minimālais līdzsvarošanās laiks, pēc kura var sākt paraugu ņemšanu, ir viena diena. Parasti vielām, kuru log P_{OW} aplēse ir zemāka par 5, paraugu ņemšanu var veikt otrajā un trešajā dienā. Hidrofobiskākiem savienojumiem līdzsvarošanas laiku var nākties pagarināt. Savienojumam ar log P_{OW} 8,23 (dekahlorobifenols) līdzsvarošanai pietika ar 144 stundām. Līdzsvaru novērtē, paraugus no tā paša trauka ņemot atkārtoti.

Eksperimenta sākšana

40. Eksperimenta sākumā reakcijas trauku uzpilda ar ūdeni, kas piesātināts ar 1-oktanolu. Jāatvēl pietiekams laiks, lai sasniegtu termostatā iestatīto temperatūru.
41. Reakcijas trauka saturam uzmanīgi pievieno vēlamo daudzumu testējamās vielas (kas izšķīdināta vajadzīgajā daudzumā ar ūdeni piesātinātā 1-oktanola). Šis ir ļoti atbildīgs testa posms, jo ir jāizvairās no abu fāžu turbulentas sajaukšanās. Šajā nolūkā 1-oktanola fāzi var lēnām iepilināt ar pipeti, tās galu vēršot pret eksperimenta trauka sienu tuvu ūdens virsmai. Šķidrums noplūdis pa stikla sienu un izveidos plēvi virs ūdens fāzes. Nedrīkst 1-oktanolu dekantēt tieši kolbā; 1-oktanola pilieni nedrīkst krist tieši ūdenī.

42. Maisīšanu sākot, maisīšanas ātrums jāpalielina pakāpeniski. Ja maisītāja motoru nav iespējams attiecīgi regulēt, varbūt jāizmanto transformators. Maisīšanas ātrums jāiestata tā, lai robežšķirtnē starp ūdeni un 1-oktanolu rastos 0,5 līdz 2,5 cm dziļš virpulis. Maisīšanas ātrums ir jāsamazina, ja virpuļa dziļums pārsniedz 2,5 cm; pretējā gadījumā ūdens fāzē no 1-oktanola pilieniem var izveidoties mikropilieni, kas noved pie testējamās vielas koncentrācijas ūdenī pārvērtēšanas. Ņemot vērā validācijas pētījumu rezultātus, kas iegūti starplaboratoriju salīdzinošās testēšanas programmā (5), ieteicamais maksimālais maisīšanas ātrums ir 2,5 cm. Tas ir kompromiss: maisot ar šādu ātrumu, fāžu līdzsvars iestājas pietiekami ātri, 1-oktanola mikropilienu veidojoties ierobežoti.

Parauga ņemšana un parauga apstrāde

43. Pirms paraugu ņemšanas maisītājs jāizslēdz un jānogaida, līdz apstājas šķidrumu kustība. Kad paraugu ņemšana pabeigta, maisītāju atkal lēnām palaiž, kā aprakstīts iepriekš, un tad maisīšanas ātrumu pakāpeniski palielina.
44. Ūdens fāzes paraugu ņem no krāna reakcijas trauka apakšā. Pirms tam no krāna izlaiž ūdens "mirušo" tilpumu (kas 2. papildinājumā attēlotajam traukam ir apmēram 5 ml). Ūdens krānā netiek maisīts un tādēļ nav līdzsvarā ar pārējo šķidrumu. Reģistrē paraugu tilpumu un raugās, lai izlaistajā ūdenī esošās testējamās vielas daudzums tiktu ņemts vērā masas bilancē. Izvairīšanās zudumi iespējami jāsamazina, ļaujot ūdenim mierīgi plūst tādā daļamajā piltuvē, lai neizjuku ūdens/1-oktanola slānis.
45. 1-oktanola paraugus iegūst, ar 100 mikrolitru šļirci, kas izgatavota no stikla un metāla, ievielkot nelielu alikvotu (apm. 100 μ l) no 1-oktanola slāņa. Jārīkojas rūpīgi, lai neizjauktu fāžu robežu. Ņemtā parauga tilpumu reģistrē. Ar nelielu alikvotu pietiek, jo 1-oktanola paraugu atšķaidīs.
46. Jāizvairās no nevajadzīgas paraugu pārvešanas. Tāpēc parauga tilpums jānosaka gravimetriski. Ūdens paraugiem tas izdarāms, ūdens paraugu ņemot daļamajā piltuvē, kurā jau iepildīts vajadzīgais daudzums šķīdinātāja.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

47. Saskaņā ar šo testēšanas metodi P_{OW} nosaka, ar pētāmo savienojumu identiskos apstākļos veicot trīs lēnās maisīšanas eksperimentus (trīs eksperimentālas vienības). Regresijai, ko izmanto līdzsvara iegūšanas pierādīšanai, jābūt balstītai uz vismaz četrām C_O/C_W noteikšanu rezultātiem secīgos laikos. Tādējādi ir iespējams aprēķināt dispersiju kā katrā eksperimenta vienībā iegūtās vidējās vērtības nenoteiktības mēru.
48. P_{OW} var raksturot ar katrā eksperimenta vienībā iegūto datu dispersiju. Šo informāciju izmanto, lai aprēķinātu P_{OW} kā atsevišķu eksperimenta vienību rezultātu vidējo svērto vērtību. Šajā nolūkā izsvēršanai izmanto eksperimentālo vienību rezultātu dispersijas apgriezto vērtību. Tādējādi dati ar lielām svārstībām (ko izsaka kā dispersiju) un tātad mazāku ticamību mazāk ietekmē rezultātu nekā dati ar nelielu dispersiju.

49. Analógiski aprēķina svērto standartnovirzi. Tā raksturo P_{OW} mērījuma atkārtojamību. Maza svērtā standartnovirze norāda, ka P_{OW} noteikšanas rezultātiem ir laba atkārtojamība vienā laboratorijā. Datu formāla statistiskā apstrāde ir aprakstīta turpmāk tekstā.

Rezultātu apstrāde

Līdzsvara sasniegšanas pierādīšana

50. Testējamās vielas koncentrāciju 1-oktanolā un ūdenī attiecības logaritmu ($\log (C_o/C_w)$) aprēķina katram paraugu ņemšanas laikam. Ķīmiskā līdzsvara sasniegšanu demonstrē ar šīs attiecības un laika sakarības grafiku. Šā grafika plato, ko nosaka vismaz pēc četriem secīgiem laika punktiem, norāda, ka līdzsvars ir sasniegts un ka savienojums ir patiešām izšķīdis 1-oktanolā. Ja tā nav, tests jāturpina, līdz četri secīgi laika punkti veido līniju, kuras slīpums ar ticamības līmeni 0,05 būtiski neatšķiras no nulles, norādot, ka $\log C_o/C_w$ nav atkarīgs no laika.

Log P_{OW} aprēķināšana

51. Eksperimentālās vienības log P_{OW} vērtību aprēķina kā vidējo svērto log C_o/C_w vērtību tai log C_o/C_w un laika sakarības grafika daļai, kurā ir pierādīts fāžu līdzsvars. Vidējo svērto vērtību aprēķina, datus izsverot pēc dispersijas apgrieztās vērtības, lai datu ietekme uz galīgo rezultātu būtu apgriezti proporcionāla datu nenoteiktībai.

Vidējais log P_{OW}

52. Dažādu eksperimentālo vienību vidējo log P_{OW} aprēķina kā vidējo vērtību no atsevišķu eksperimentālo vienību rezultātiem, kas izsvērti pēc to attiecīgajām dispersijām.

Aprēķinus veic pēc formulas:

$$\log P_{OW,Av} = (\sum w_i \times \log P_{OW,i}) \times (\sum w_i)^{-1}$$

kur:

$\log P_{OW,i}$ = i-tās eksperimentālās vienības log P_{OW} vērtība;

$\log P_{OW,Av}$ = individuālā log P_{OW} vidējā svērtā vērtība;

w_i = statistiskais svars, ko piešķir i-tās eksperimentālās vienības log P_{OW} vērtībai.

Log $P_{OW,i}$ dispersijas apgrieztu lielumu izmanto kā w_i ($w_i = \text{var}(\log P_{OW,i})^{-1}$).

53. Log P_{OW} vidējās vērtības kļūdu aprēķina kā log C_o/C_w atkārtojamību, ko laikā pēc fāžu līdzsvara sasniegšanas nosaka individuālajām eksperimenta vienībām. To izsaka kā log $P_{OW,Av}$ ($\sigma_{\log P_{OW,Av}}$) svērto standartnovirzi, kas savukārt ir ar log $P_{OW,Av}$ saistītās kļūdas mērs. Svērto standartnovirzi no svērtās dispersijas ($\text{var}_{\log P_{OW,Av}}$) var aprēķināt šādi:

$$\text{var}_{\log P_{OW,Av}} = (\sum w_i \times (\log P_{OW,i} - \log P_{OW,Av})^2) \times (\sum w_i \times (n - 1))^{-1}$$

$$\sigma_{\log P_{OW,Av}} = (\text{var}_{\log P_{OW,Av}})^{0,5}$$

Ar n apzīmē eksperimentālo vienību skaitu.

Testēšanas ziņojums

54. Testēšanas ziņojumā jāsniedz šāda informācija:

Testējamā viela:

- ikdienas nosaukums, ķīmiskais nosaukums, CAS numurs, struktūrformula (norādot iezīmēto vietu, ja lieto radioaktīvi iezīmētu vielu) un attiecīgās fizikālķīmiskās īpašības (sk. 17. punktu),
- testējamās vielas tīrība (piemaisījumi),
- iezīmētu ķīmisko vielu iezīmes tīrība un molārā aktivitāte (kur piemērojams),
- log P_{ow} provizorisks aplēse un tās iegūšanai izmantotā metode.

Testēšanas apstākļi:

- pētījumu norises datumi,
- temperatūra eksperimenta laikā,
- 1-oktanola un ūdens tilpums testa sākumā,
- ņemto 1-oktanola un ūdens paraugu tilpumi,
- testa traukos palikušā 1-oktanola un ūdens tilpumi,
- izmantoto testa trauku un maisīšanas apstākļu apraksts (maisīšanas stienīša un testa trauka forma, virpuļa augstums mm un, ja iespējams, maisīšanas ātrums),
- analītiskā metode, kas izmantota, lai noteiktu testējamo vielu, un ar metodi saistītā kvantificēšanas robeža,
- paraugu ņemšanas laiki,
- ūdens fāzes pH un izmantotie buferšķīdumi, ja jonus veidojošām molekulām pH tiek koriģēts,
- atkārtojumu skaits.

Rezultāti:

- izmantoto analītisko metožu atkārtojamība un jutība,
- noteiktā testējamās vielas koncentrācija 1-oktanolā un ūdenī atkarībā no laika,
- masas bilances demonstrācija,
- temperatūra un standartnovirze vai arī temperatūras diapazons testa laikā,
- koncentrāciju attiecības regresija attiecībā pret laiku,
- $\log P_{ow,Av}$ vidējā vērtība un tās standartklūda,
- rezultātu iztīrījums un interpretācija,
- neapstrādātu reprezentatīvas analīzes skaitlisko datu piemēri (visi neapstrādātie izejdati jāuzglabā saskaņā ar labas laboratoriju prakses standartiem), arī attiecībā uz surogātstandartu atgūstamību, kalibrēšanas punktu skaits (kopā ar kalibrēšanas līknes korelācijas koeficienta kritērijiem) un kvalitātes nodrošināšanas / kvalitātes kontroles rezultāti,
- ja pieejams: noteikšanas procedūras validēšanas ziņojums (jānorāda ar atsauci).

LITERATŪRA

- (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) Šā pielikuma A.8. nodaļa "Sadalījuma koeficients".
- (3) Šā pielikuma A.8. nodaļa "Sadalījuma koeficients".
- (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) Šā pielikuma A.6. nodaļa "Šķīdība ūdenī".
- (11) Šā pielikuma C.7. nodaļa "Noārdīšanās – abiotiska noārdīšanās hidrolīze atkarībā no pH".
- (12) Šā pielikuma C.4. nodaļa – II–VII daļa (A–F metode) "Vieglas bionoārdīšanās spējas noteikšana".
- (13) Šā pielikuma A.4. nodaļa "Tvaika spiediens".
- (14) Pinsuan 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.
- (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.
-

1. papildinājums

Rēķintabula minimālo ūdens daudzumu aprēķināšanai, kuri vajadzīgi, lai ūdens fāzē noteiktu testējamās vielas ar dažādām log P_{ow} vērtībām

Pieņēmumi:

- atsevišķu alikvotu maksimālais daudzums = 10 % no kopējā daudzuma; 5 alikvotas = 50 % no kopējā daudzuma,
- testejamu vielu koncentrācija = 0,7 × šķidība jebkura fāzē; zemāku koncentrāciju gadījumā būtu vajadzīgi lielāki daudzumi,
- LOD noteikšanā izmantotais daudzums = 100 ml,
- log P_{ow} attiecībā pret log S_w un log P_{ow} attiecībā pret SR (S_{okt}/S_w) pamatoti parāda ar testējamām vielām saistītās sakarības.

S_w noteikšana

log P _{ow}	Vienādojums	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_{okt} noteikšana

log P _{ow}	Vienādojums	S _{okt} (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

Testējamās vielas kopējā masa (mg)	Masa _{okt.} /masa _{ūdens}	Masa _{H2O} (mg)	Konc _{H2O} (mg/l)	Masa _{okt.} (mg)	Konc _{okt.} (mg/l)
1 319	526	2,5017	2,6333	1 317	26 333

Testējamās vielas kopējā masa (mg)	Masa _{okt.} /masa _{ūdens}	Masa _{H₂O} (mg)	Konc. _{H₂O} (mg/l)	Masa _{okt.} (mg)	Konc. _{okt.} (mg/l)
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

Vērtību aprēķināšana

Minimālais daudzums, kas vajadzīgs H₂O fāzē katrā LOD koncentrācijā

log K _{ow}	LOD (mikrogrami/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
Daudzums, ko izmanto LOD (l)	0,1					

Aprēķinu atslēga

Veido < 10 % no ūdens fāzes kopējā daudzuma, 1 litra līdzsvarošanas trauks.

Veido < 10 % no ūdens fāzes kopējā daudzuma, 2 litru līdzsvarošanas trauks.

Veido < 10 % no ūdens fāzes kopējā daudzuma, 5 litru līdzsvarošanas trauks.

Veido < 10 % no ūdens fāzes kopējā daudzuma, 10 litru līdzsvarošanas trauks.

Pārsniedz 10 % pat no 10 litru līdzsvarošanas trauka.

Vajadzīgo daudzumu pārskats atkarībā no šķīdības ūdenī un Log P_{ow}

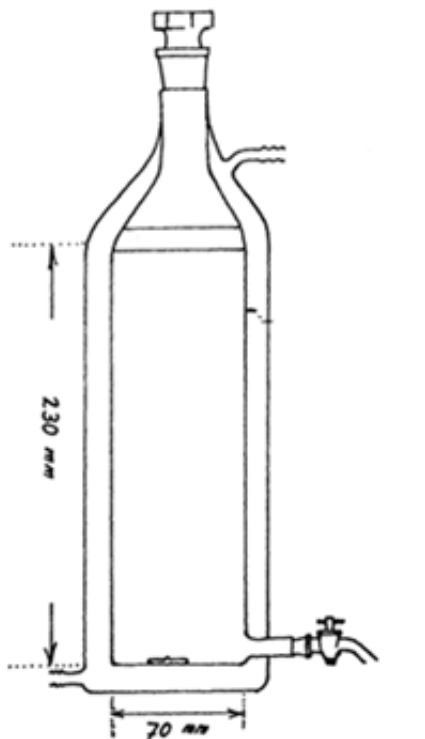
Minimālais daudzums, kas vajadzīgs H₂O fāzē katrā LOD koncentrācijā (ml)

log P _{ow}	S _w (mg/l)	LOD (mikrogrami/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

log P _{ow}	S _w (mg/l)	LOD (mikrogrami/l)→	0,001	0,01	0,10	1,00	10
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
	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
Daudzums, ko izmanto LOD (l)		0,1					

2. papildinājums

Stikla apvalkā ietverts testēšanas trauks, ko izmanto P_{ow} eksperimentālai noteikšanai pēc lēnās maisīšanas metodes



3) pielikuma B.2. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.2. AKŪTĀ INHALĀCIJAS TOKSICITĀTE

IEVADS

- Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 403 (2009. gads) (1). Akūtajai inhalācijas toksicitātei vēltos Testēšanas norādījumus 403 (TG 403) pieņēma 1981. gadā. Šī pārskatītā B.2. testēšanas metode (kā pārskatīto TG 403 ekvivalents) ir izstrādāta tā, lai tā būtu elastīgāka, samazinātu dzīvnieku izmantošanu un nodrošinātu regulatīvās vajadzības. Pārskatītā testēšanas metode aptver divu veidu pētījumus, proti, tradicionālo LC_{50} protokolu un koncentrācija $\times$ laiks ($C \times t$) protokolu. Šīs testēšanas metodes galvenās iezīmes ir iespēja nodrošināt koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarību diapazonā no neletāliem līdz letāliem iznākumiem, lai uzzinātu vidējo letālo koncentrāciju (LC_{50}), neletālo sliekšņa koncentrāciju (piemēram, LC_{01}) un sakarības slīpumu un noteiktu iespējamu uzņēmības atkarību no dzimuma. $C \times t$ protokols ir jāizmanto gadījumos, kad pastāv konkrēta regulatīva vai zinātniska vajadzība, kuras dēļ ir nepieciešami testi ar dzīvniekiem ar vairākiem ilgumiem, piemēram, plānošanai attiecībā uz reaģēšanu ārkārtas situācijās (piemēram, akūtas ekspozīcijas norāžu līmeņu (AEGL) iegūšana, norādījumi plānošanai attiecībā uz reaģēšanu ārkārtas situācijās (ERPG) vai akūtas ekspozīcijas robežlīmeņu (AETL) vērtības) vai zemes izmantošanas plānošanai.
- Norādījumi par šīs testēšanas metodes pētījumu veikšanu un interpretēšanu ir pieejami *Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing* (GD 39) (2).
- Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas šīs nodaļas beigās un GD 39 (2).
- Šī testēšanas metode ļauj raksturot testējamās ķīmiskās vielas un kvantitatīvi novērtēt risku, kā arī ļauj novērtēt un klasificēt testējamās ķīmiskās vielas saskaņā ar Regulu (EK) Nr. 1272/2008 (3). GD 39 (2) ir sniegti norādījumi, kā izvēlēties attiecīgu testēšanas metodi akūtas toksicitātes testēšanai. Ja ir vajadzīga vienīgi informācija par klasifikāciju un marķējumiem, parasti ieteicams izmantot šā pielikuma B.52. nodaļu (4) (sk. GD 39 (2)). Šī B.2. testēšanas metode nav īpaši paredzēta specializētu materiālu, piemēram, mazšķīstošu izometrisku materiālu vai šķiedrmateriālu, vai rūpnieciski ražotu nanomateriālu, testēšanai.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

5. Lai līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu testos, testēšanas laboratorijai, pirms tā apsver, vai testēšanu neveikt saskaņā ar šo metodi, ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu, arī līdzšinējie pētījumi (piemēram, šā pielikuma B.52. nodaļa (4)), kuru dati palīdzētu izvairīties no papildu testēšanas. Informācija, kas varētu palīdzēt piemērotāko sugu, līniju, dzimuma, ekspozīcijas režīma un attiecīgu testa koncentrāciju izvēlē, ietver testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes testu rezultātus; paredzētos lietošanas veidus un cilvēka ekspozīcijas iespējamību; pieejamos (Q)SAR datus un toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām vielām (sk. GD 39 (2)).
6. Ciktāl iespējams, ir jāizvairās no testiem ar kodīgām un/vai kairinošām testējamām ķīmiskām vielām koncentrācijās, kas, visticamāk, radīs stipras sāpes un/vai ciešanas. Kodīguma/kairinājuma potenciāls ir jānovērtē eksperimenti, izmantojot tādas liecības kā pieredze ar cilvēkiem un dzīvniekiem (piemēram, no atkārtotas devas pētījumiem, kas veikti ar nekodīgām/nekairinošām koncentrācijām), esošie *in vitro* dati (piemēram, no šā pielikuma B.40. nodaļas (5), B.40.a nodaļas (6) vai ESAO TG 435 (7)), pH vērtības, informācija par līdzīgām vielām vai jebkādi citi derīgi dati, lai noskaidrotu, vai varētu neveikt turpmākus testus. Tā kā šī testēšanas metode pētījuma vadītājam vai galvenajam pētniekam nodrošina mērķkoncentrāciju izvēles kontrolēšanas iespēju, šo metodi var izmantot, lai pakļautu dzīvniekus šādu materiālu iedarbībai sakarā ar konkrētām regulatīvām vajadzībām (piemēram, ārkārtas situāciju plānošanai). Tomēr mērķkoncentrācijā nedrīkst būt smaga kairinoša/kodīga iedarbība, lai gan tai jābūt pietiekamai, lai koncentrācijas un atbildes reakcijas līkne pagarinātos līdz līmeņiem, kas sasniedz testa regulatīvo un zinātnisko mērķi. Šīs koncentrācijas ir jāizvēlas katrā gadījumā atsevišķi, kā arī jāsniedz koncentrāciju izvēles pamatojums (sk. GD 39 (2)).

TESTA PRINCIPS

7. Šī pārskatītā B.2. testēšanas metode ir paredzēta tam, lai attiecībā uz vienu vai abiem dzimumiem, kā nepieciešams kvantitatīvajos riska novērtējumos, iegūtu testējamās ķīmiskās vielas klasificēšanai pietiekamu informāciju par tās akūto toksicitāti, kā arī datus par mirstību (piemēram, LC₅₀, LC₀₁ un slīpums). Šīs testēšanas metožu apraksts piedāvā divas metodes. Pirmā metode ir tradicionālais protokols, kurā dzīvnieku grupas tiek pakļautas robežkoncentrācijai (pieļaujamā daudzuma tests) vai koncentrāciju sērijai vairākpakāpju procedūrā uz iepriekš noteiktu ilgumu, kas parasti ir četras stundas. Konkrētām regulatīvām vajadzībām var izmantot citus ekspozīcijas ilgumus. Otrā metode ir (C × t) protokols, kurā dzīvnieku grupas tiek pakļautas vienai koncentrācijai (robežkoncentrācijai) vai vairāku koncentrāciju sērijai vairākos periodos.
8. Mirstoši dzīvnieki, kā arī dzīvnieki, kas acīm redzami cieš sāpes vai pārdzīvo stipras un ilgstošas ciešanas, ir humāni jānonāvē, un, interpretējot testa rezultātus, tie jāuzlūko tāpat kā testā nobeigušies dzīvnieki. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu nonāvēt mirstošus dzīvniekus un dzīvniekus, kam ir smagas ciešanas, kā arī norādījumi par paredzamu vai neizbēgamu nobeigšanos ir sniegti ESAO *Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints* (8).

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

9. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši dzīvnieki, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Ieteicamā suga ir žurka. Ja tiek izmantotas citas sugas, tas jāpamato.

Dzīvnieku sagatavošana

10. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ekspozīcijas dienā dzīvniekiem jābūt jauniem pieaugušiem (8–12 nedēļas veciem) dzīvniekiem ar ķermeņa svaru, kas nepārsniedz ± 20 % no jebkādu iedarbībai iepriekš pakļautu tāda paša vecuma abu dzimumu dzīvnieku vidējā ķermeņa svara. Dzīvniekus izvēlas nejausīnāti un marķē individuālai identificēšanai. Dzīvniekus līdz testa sākumam vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos. Dzīvnieki īsu laiku pirms testa sākšanas ir jāaklimatizē arī attiecībā uz testa aprīkojumu, jo tas samazinās jaunās vides radīto stresu.

Dzīvnieku turēšana

11. Temperatūrai testa dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 ± 3 °C. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt 30–70 % diapazonā, lai gan tas var būt neiespējami, ja par nesējvielu izmanto ūdeni. Pirms un pēc ekspozīcijām dzīvnieki parasti ir jātur būros grupās pēc dzimuma un koncentrācijas, bet dzīvnieku skaits būrī nedrīkst traucēt katra dzīvnieka novērošanu, kā arī dzīvnieku skaitam jābūt tādam, lai iespējami mazāki būtu zudumi kanibālisma un kaušanās dēļ. Ja tiek izmantota vienīgi dzīvnieka deguna ekspozīcija, var būt vajadzīgs dzīvniekus aklimatizēt fiksācijas caurulēm. Fiksācijas caurules nedrīkst dzīvniekiem radīt nevajadzīgu fizisku, termisku vai imobilizācijas risku. Fiksācija var ietekmēt fizioloģiskos beigupunktus, piemēram, ķermeņa temperatūru (hipertermija) un/vai plaušu minūtes tilpumu. Ja ir pieejami vispārīgi dati, kas apliecina, ka nekādas šādas pārmaiņas nerodas vērā ņemamā apmērā, iepriekšēja pielāgošanās fiksācijas caurulēm nav vajadzīga. Ja tiek izmantota visa ķermeņa ekspozīcija aerosolam, dzīvnieki ekspozīcijas laikā ir jātur atsevišķi, lai tie nevarētu uzņemt testējamo aerosolu

no citu būra dzīvnieku apmatojuma. Izņemot ekspozīcijas laiku, var izmantot tradicionālu un sertificētu laboratorijas uzturu, ko papildina ar neierobežotu daudzumu krāna dzeramā ūdens. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas tumsā.

Inhalācijas kameras

12. Izvēloties inhalācijas kameru, jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas īpašības un testa mērķis. Visieteicamākā metode ir dzīvnieka deguna ekspozīcija (šis termins aptver dzīvnieka galvas, deguna vai snuķa ekspozīciju). Dzīvnieka deguna ekspozīcija ir parasti ieteicama šķidro vai cieto aerosolu pētījumiem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Pētījuma konkrētos mērķus, iespējams, var labāk sasniegt, izmantojot visa ķermeņa ekspozīciju, bet tas ir jāpamato pētījuma ziņojumā. Lai nodrošinātu atmosfēras stabilitāti, izmantojot visa ķermeņa kameru, testa dzīvnieku kopējais apjoms nedrīkst pārsniegt 5 % no kameras tilpuma. Deguna un visa ķermeņa ekspozīcijas paņēmieni principi un to konkrētās priekšrocības un trūkumi ir aprakstīti GD 39 (2).

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻI

Koncentrāciju ievadīšana

13. Deguna ekspozīcija žurkām var ilgt līdz sešām stundām. Ja deguna ekspozīciju veic pelēm, ekspozīcijām parasti nevajadzētu ilgt vairāk par četrām stundām. Ja ir vajadzīgi ilgāki pētījumi, tas jāpamato (sk. GD 39 (2)). Dzīvnieki, kas aerosola iedarbībai tiek pakļauti visa ķermeņa kamerās, ir jātur atsevišķi, lai nepieļautu, ka citi būra dzīvnieki testējamo ķīmisko vielu uzņem, laizot eksponētos dzīvniekus. Ekspozīcijas periodā dzīvniekus nevajadzētu barot. Visa ķermeņa ekspozīcijas laikā var pastāvīgi nodrošināt ar ūdeni.
14. Dzīvnieki tiek pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai gāzes, tvaiku, aerosola vai to sajaukuma veidā. Testējamais agregātstāvoklis ir atkarīgs no testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, izraudzītās koncentrācijas un/vai fizikālās formas, kas testējamās ķīmiskās vielas apstrādes un izmantošanas laikā ir visvarbūtīgākā. Higroskopiskas un ķīmiski reaģējošas testējamās ķīmiskās vielas ir jātestē sausa gaisa apstākļos. Jāuzmanās, lai izvairītos no sprādzienbīstamu koncentrāciju ģenerēšanas.

Daļiņu sadalījums pēc lieluma

15. Daļiņu sadalījums pēc lieluma jānoteic visiem aerosoliem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Lai nodrošinātu visu elpošanas sistēmas attiecīgo rajonu ekspozīciju, ir ieteicami aerosoli ar masas vidējo aerodinamisko diametru (MMAD) diapazonā no 1 līdz 4 μm ar ģeometrisko standartnovirzi (σ_g) diapazonā no 1,5 līdz 3,0 (2) (9) (10). Iespēju robežās ir jācenšas nodrošināt atbilstību šim standartam, bet, ja tas nav iespējams, ir jāsniedz eksperta atzinums. Piemēram, metālu izgarojumu daļiņas var būt mazākas par šo standartu, savukārt lādētas daļiņas, šķiedrmateriāli un higroskopiski materiāli (kas elpošanas sistēmas mitrajā vidē izpļešas) šo standartu var pārsniegt.

Testējamās ķīmiskās vielas sagatavošana nesējvielā

16. Lai ģenerētu testējamās ķīmiskās vielas attiecīgu koncentrāciju un daļiņu lielumu atmosfērā, var izmantot nesējvielu. Ieteicamā nesējviela visos gadījumos noteikti ir ūdens. Lai panāktu vajadzīgo daļiņu sadalījumu pēc lieluma, daļiņu materiālu var pakļaut mehāniskiem procesiem, tomēr jānodrošina, lai testējamā ķīmiskā viela nesadalītos un nepārmainītos. Gadījumos, kad uzskata, ka mehāniski procesi ir mainījuši testējamās ķīmiskās vielas sastāvu (pārāk augstās temperatūrās, ko pārāk intensīvā malšanā radījusi berze), testējamās ķīmiskās vielas sastāvs ir analītiski jāpārbauda. Jāievēro attiecīga piesardzība, lai testējamo ķīmisko vielu nepiesārņotu. Nav nepieciešams testēt nedrūpošus graudveida materiālus, kas ir izstrādāti tā, lai būtu neieelpojami. Jāveic berzes tests, lai pierādītu, ka, graudveida materiālus apstrādājot, nerodas ieelpojamas daļiņas. Ja berzes testā tiek iegūtas ieelpojamas daļiņas, jāveic inhalācijas toksicitātes tests.

Kontroldzīvnieki

17. Līdztekus veiktas negatīvas (gaisa) kontroles grupa nav vajadzīga. Ja testa atmosfēras ģenerēšanā izmanto nesējvielu, kas nav ūdens, nesējvielas kontroles grupa jāizmanto tikai tad, ja nav pieejami vēsturiski inhalācijas toksicitātes dati. Ja nesējvielā iestrādātas testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes pētījums toksicitāti neatklāj, secina, ka nesējviela pārbaudītajā koncentrācijā nav toksiska; tādējādi nesējvielas kontroles grupa nav nepieciešama.

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻU MONITORINGS

Gaisa plūsma caur kameru

18. Katras ekspozīcijas laikā ir rūpīgi jākontrolē, nepārtraukti jāmonitorē un vismaz reizi stundā jāreģistrē gaisa plūsma caur kameru. Testa atmosfēras koncentrācijas (vai stabilitātes) monitorings ir visu dinamisko parametru integrāla mērīšana, kas dod iespēju netieši kontrolēt visus attiecīgos dinamiskos atmosfēras ģenerēšanas parametrus. Īpaši jāraugās, lai deguna ekspozīcijas kamerās nenotiktu izelpotā gaisa ieelpošana gadījumos, kur gaisa

plūsmas ekspozīcijas sistēmā nav pietiekama, lai nodrošinātu testējamās ķīmiskās vielas atmosfēras dinamisku plūsmu. Ir pieejamas metodikas, ko var izmantot, lai pierādītu, ka konkrētos darbības apstākļos atkārtota ieelpošana nenotiek (2) (11). Skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 19 %, un oglekļa dioksīda koncentrācija nedrīkst pārsniegt 1 %. Ja ir pamats uzskatīt, ka nav iespējams nodrošināt atbilstību šiem standartiem, skābekļa un oglekļa dioksīda koncentrācijas ir jāizmēra.

Temperatūra un relatīvais mitrums kamerā

19. Temperatūra kamerā jāuztur 22 ± 3 °C robežās. Relatīvais mitrums dzīvnieku inhalācijas zonā gan deguna, gan visa ķermeņa ekspozīciju gadījumā ir jāmonitorē un jāreģistrē vismaz trīs reizes, ja tests ilgst līdz četrām stundām, un reizi stundā, ja tas ir īsāks. Relatīvo mitrumu vēlamā uzturēt 30–70 % diapazonā, bet tas var nebūt izdarāms (piemēram, kad tiek testēti maisījumi uz ūdens bāzes) vai izmērāms, jo testējamā ķīmiskā viela interferē ar testēšanas metodi.

Testējamā ķīmiskā viela: nominālā koncentrācija

20. Kad vien iespējams, ir jāaprēķina un jāreģistrē nominālā koncentrācija ekspozīcijas kamerā. Nominālā koncentrācija ir ģenerētās testējamās ķīmiskās vielas masa, ko daļa ar kameras sistēmai cauri izlaistā gaisa kopējo tilpumu. Nominālo koncentrāciju neizmanto, lai raksturotu dzīvnieku ekspozīciju, taču nominālās koncentrācijas un faktiskās koncentrācijas salīdzinājums sniedz norādes par testa sistēmas ģenerēšanas efektivitāti, tādējādi to var izmantot, lai atklātu ģenerēšanas problēmas.

Testējamā ķīmiskā viela: faktiskā koncentrācija

21. Faktiskā koncentrācija ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija dzīvnieku inhalācijas zonā inhalācijas kamerā. Faktiskās koncentrācijas var uzzināt ar specifiskām metodēm (piemēram, tiešo paraugu ņemšanu, adsorbācijas vai ķīmiskās reaģēšanas metodēm un turpmāku analītisko raksturošanu) vai ar tādām nespecifiskām metodēm kā gravimetriskā filtra analīze. Gravimetriskās analīzes izmantošana ir pieņemama tikai attiecībā uz vienas sastāvdaļas pulvera aerosoliem vai aerosoliem ar zemas gaistamības šķidrumiem, turklāt šī analīze ir jābalsta uz attiecīgiem testējamās ķīmiskās vielas raksturojumiem pirms pētījuma veikšanas. Koncentrācijas noteikšanu ar gravimetrisko analīzi var veikt arī vairāku sastāvdaļu pulvera aerosoliem. Tomēr tam ir vajadzīgi analītiskie dati, kas pierāda, ka gaisā pārnēstajam materiālam ir tāds pats sastāvs kā sākotnējam materiālam. Ja šāda informācija nav pieejama, pētījuma laikā var būt nepieciešams ar regulāriem intervāliem atkārtoti analizēt testējamo ķīmisko vielu (vēlams, kad tā tiek pārnēsāta gaisā). Attiecībā uz aerosola preparātiem, kas var iztvaikot vai sublimēties, ir jāpierāda, ka visas fāzes tika ievāktas ar izraudzīto metodi. Mērķkoncentrācija, nominālā un faktiskā koncentrācija ir jānorāda pētījuma ziņojumā, bet statistiskajā analīzē, kurā aprēķina letālo koncentrāciju vērtības, izmanto vienīgi faktiskās koncentrācijas.
22. Ja iespējams, jāizmanto vienas sērijas testējamā ķīmiskā viela, un testējamais paraugs ir jāglabā apstākļos, kas uztur tā tīrību, homogenitāti un stabilitāti. Pirms pētījuma sākšanas ir jābūt noteiktām testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, arī tās tīrībai un, ja tehniski iespējams, identitātei, un konstatēto piesārņotāju un piemaisījumu daudzumam. To var pierādīt ar šādiem datiem (bet ne tikai): aiztures laiks un relatīvā maksimuma zona, molekulas masas no maspektrometrijas vai gāzhromatogrāfijas analīzes, vai citām aplēsēm. Lai gan testēšanas laboratorija nav atbildīga par testējamā parauga identitāti, tai būtu ieteicams vismaz zināmā mērā pārliecināties par sponsora sniegto raksturojumu (piemēram, krāsa, fizikālās īpašības utt.).
23. Ekspozīcijas atmosfēru uztur iespējami nemainīgu un nepārtraukti un/vai periodiski monitorē atkarībā no analīzes metodes. Ja paraugus ņem periodiski, četru stundu pētījuma laikā kameras atmosfēras paraugi ir jāņem vismaz divas reizes. Ja sakarā ar ierobežotu gaisa caurplūdumu vai zemu koncentrāciju tas nav iespējams, visā ekspozīcijas periodā var paņemt vienu paraugu. Ja tiek konstatētas ievērojamas svārstības starp paraugiem, nākamā koncentrāciju testēšanā katras ekspozīcijas laikā jāņem četri paraugi. Atsevišķiem kameras koncentrācijas paraugiem no vidējās koncentrācijas nevajadzētu atšķirties vairāk kā par ± 10 % gāzēm un tvaikiem vai vairāk kā par ± 20 % šķidriem vai cieti aerosoliem. Ir jāaprēķina un jāreģistrē laiks, kas vajadzīgs, līdz kamerā iestājas līdzsvara stāvoklis (t_{95}). Ekspozīcijas ilgums atbilst visam laikam, kad testējamā ķīmiskā viela tiek ģenerēta, ieskaitot laiku, kas vajadzīgs, lai sasniegtu t_{95} . Norādījumi par t_{95} aplēsēm ir sniegti GD 39 (2).
24. Ļoti sarežģītiem maisījumiem, kas sastāv no gāzēm/tvaikiem, un aerosoliem (piemēram, degšanas atmosfērām un testējamām ķīmiskām vielām, kuru izplūde notiek no konkrētam galalietojumam paredzētiem izstrādājumiem/ierīcēm) katrā fāzē inhalācijas kamerā var izturēties atšķirīgi, tāpēc katrai fāzei (gāze/tvaiki un aerosols) ir jāizvēlas vismaz viena indikatorviela (analīts), kas parasti ir maisījuma galvenā aktīvā viela. Ja testējamā ķīmiskā viela ir maisījums, analītiskā koncentrācija ir jānorāda maisījumam, nevis tikai aktīvajai vielai vai komponentam (analītam). Papildu informācija par faktiskajām koncentrācijām ir pieejama GD 39 (2).

Testējamā ķīmiskā viela: daļiņu sadalījums pēc lieluma

25. Katras četru stundu ekspozīcijas laikā aerosolu daļiņu sadalījums pēc lieluma jānosaka vismaz divas reizes, izmantojot kaskādes impaktoru vai alternatīvu instrumentu, piemēram, aerodinamisko daļiņu mērītāju. Ja var pierādīt, ka ar kaskādes impaktoru vai alternatīvo instrumentu iegūtie rezultāti ir līdzvērtīgi, alternatīvo instrumentu var izmantot visā pētījumā. Lai iegūtu apstiprinājumu, ka galvenais ievākšanas instruments nodrošina pietiekamu vākšanas efektivitāti, paralēli šim galvenajam instrumentam ir jāizmanto otra iekārta, piemēram, gravimetriskais filtrs vai atsītējs/gāzes barbotieris. Daļiņu lieluma analizē iegūtajai masas koncentrācijas vērtībai jābūt saprātīgās robežās salīdzinājumā ar filtra analizē iegūto masas koncentrācijas vērtību (sk. GD 39 (2)). Ja pētījuma agrīnā posmā var pierādīt līdzvērtību, turpmāki apstiprinoši mērījumi nav vajadzīgi. Dzīvnieku labturības nolūkos jāveic pasākumi, kas iespējami mazinātu nepārliciešo datu iegūvi, kuru dēļ var būt nepieciešams atkārtot ekspozīciju. Ir jānosaka daļiņu lielums tādiem tvaikiem, kuru kondensāts varētu izveidot aerosolu vai kuru veidotā atmosfērā tiek konstatētas daļiņas, kas liek domāt par jauktu fāžu iespējamību (sk. 15. punktu).

PROCEDŪRA

26. Turpmāk ir aprakstīti divu veidu pētījumi, proti, tradicionālais protokols un $C \times t$ protokols. Abos protokolos var ietilpt devu diapazona pētījums, galvenais pētījums un/vai pieļaujamā daudzuma tests (tradicionālais protokols) vai testēšana ar robežkoncentrāciju ($C \times t$). Ja ir zināms, ka viens no dzimumiem ir uzņēmīgāks, pētījuma vadītājs var izvēlēties veikt šos pētījumus tikai ar uzņēmīgo dzimumu. Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti grauzēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var koriģēt tā, lai iespējami mazinātu attiecīgajai sugai raksturīgās ciešanas. Lai dzīvnieku izmantošanu samazinātu līdz minimumam, pirms testa sākšanas jāizskata visi pieejamie dati. Piemēram, dati, kas iegūti, izmantojot šā pielikuma B.52. nodaļu (4), var nozīmēt, ka nav vajadzīgs devu diapazona pētījums, kā arī var parādīt, vai kāds no dzimumiem ir uzņēmīgāks (sk. GD 39 (2)).

TRADICIONĀLAIS PROTOKOLS**Vispārīgi apsvērumi: tradicionālais protokols**

27. Tradicionālajā pētījumā dzīvnieku grupas iepriekš noteiktu laiku (parasti četras stundas) tiek pakļautas testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai vai nu deguna ekspozīcijas, vai visa ķermeņa ekspozīcijas kamerā. Dzīvnieki tiek pakļauti vai nu robežkoncentrācijai (pieļaujamā daudzuma tests), vai vismaz trijām koncentrācijām vairākpakāpju procedūrā (galvenais pētījums). Pirms galvenā pētījuma var veikt devu diapazona pētījumu, ja vien kaut kāda apjoma informācija par testējamo ķīmisko vielu, piemēram, iepriekš veikts B.52. nodaļas pētījums (sk. GD 39 (2)), nav jau pieejama.

Devu diapazona pētījums: tradicionālais protokols

28. Devu diapazona pētījumu izmanto, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas iedarbīgumu, konstatētu uzņēmīguma atšķirības starp dzimumiem un palīdzētu izvēlēties ekspozīcijas koncentrācijas līmeņus galvenajam pētījumam vai pieļaujamā daudzuma testam. Izvēloties koncentrācijas līmeņus devu diapazona pētījumam, jāizmanto visa pieejamā informācija, arī pieejamie (Q)SAR dati un dati par līdzīgām ķīmiskām vielām. Katras koncentrācijas iedarbībai nevajadzētu pakļaut vairāk kā trīs tēviņus un trīs mātītes (lai noteiktu atšķirības starp dzimumiem, var būt vajadzīgi trīs dzīvnieki no katra dzimuma). Devu diapazona pētījumā var izmantot vienu koncentrāciju, bet vajadzības gadījumā var testēt vairākas koncentrācijas. Devu diapazona pētījumā nevajag testēt tik daudz dzīvnieku un koncentrāciju, it kā tas būtu galvenais pētījums. Devu diapazona pētījuma vietā var izmantot iepriekš veiktu B.52. nodaļas pētījumu (4) (sk. GD 39 (2)).

Pieļaujamā daudzuma tests: tradicionālais protokols

29. Pieļaujamā daudzuma testu izmanto gadījumos, kad par testējamo ķīmisko vielu ir zināms vai sagaidāms, ka tā faktiski būs netoksiska, t. i., tā izraisīs toksisku atbildes reakciju tikai tad, ja koncentrācija pārsniedz regulatīvo robežkoncentrāciju. Pieļaujamā daudzuma testā testējamās ķīmiskās vielas robežkoncentrācijas iedarbībai pakļauj vienu grupu, kurā ir trīs tēviņi un trīs mātītes. Informāciju par testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu var iegūt no zināšanām par līdzīgām pārbaudītām ķīmiskām vielām, ņemot vērā to sastāvdaļu identitāti un procentuālo saturu, par kurām ir zināms, ka tās ir toksikoloģiski būtiskas. Situācijās, kad nav informācijas par toksiskumu vai tā ir nepietiekama, vai arī ir paredzams, ka testējamā ķīmiskā viela būs toksiska, ir jāveic galvenais tests.
30. Robežkoncentrāciju izvēle parasti ir atkarīga no regulatīvajām prasībām. Ja piemēro Regulu (EK) Nr. 1272/2008, gāzu, tvaiku un aerosolu robežkoncentrācijas ir attiecīgi 20 000 ppm, 20 mg/l un 5 mg/l (vai maksimālā sasniedzamā koncentrācija) (3). Tehniski var būt grūti generēt dažu testējamo ķīmisko vielu, it sevišķi tvaiku un aerosolu, robežkoncentrācijas. Testējot aerosolus, galvenajam mērķim jābūt ieelpojama lieluma daļiņu iegūšanai (1–4 μm MMAD). Ar lielāko daļu testējamo ķīmisko vielu tas ir iespējams koncentrācijā 2 mg/l. Testus ar aerosoliem koncentrācijā, kas pārsniedz 2 mg/l, drīkst veikt tikai tad, ja var iegūt ieelpojama lieluma daļiņas (sk. GD 39 (2)). Regulā (EK) Nr. 1272/2008 dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ iesaka izvairīties no testiem ar koncentrācijām, kas pārsniedz robežkoncentrācijas (3). Vai neveikt testēšanu ar robežkoncentrāciju, būtu jāapsver tikai tad, ja ļoti iespējams, ka šāda testa rezultāti būtu tieši nozīmīgi cilvēku veselības aizsardzībai (3), un pētījuma ziņojumā tas jāpamato. Sprādzienbīstamu testējamo ķīmisko vielu gadījumā ir jācenšas izvairīties no apstākļiem, kuros var izraisīties sprādziens. Lai lieki neizmantotu dzīvniekus, pirms pieļaujamā daudzuma testa ir jāveic tests bez dzīvniekiem, nodrošinot, ka pieļaujamā daudzuma testa kameras apstākļi ir sasniedzami.

31. Ja ar robežkoncentrāciju tiek novērota mirstība (nāve un/vai pirmsnāves stāvoklis), pieļaujamā daudzuma testa rezultātus var izmantot par devu diapazona pētījumu turpmākai testēšanai ar citām koncentrācijām (sk. galveno pētījumu). Ja testējamās ķīmiskās vielas fizikālās vai ķīmiskās īpašības neļauj sasniegt robežkoncentrāciju, tests jāveic ar maksimālo sasniedzamo koncentrāciju. Ja ar maksimālo sasniedzamo koncentrāciju nesasniedz 50 %, turpmāka testēšana nav vajadzīga. Ja robežkoncentrāciju sasniegt nav bijis iespējams, pētījuma ziņojumā jāsniedz paskaidrojums un pamatojoši dati. Ja maksimālā sasniedzamā tvaika koncentrācija nerada toksisku reakciju, var būt vajadzīgs ģenerēt testējamo ķīmisko vielu kā šķidru aerosolu.

Galvenais pētījums: tradicionālais protokols

32. Galveno pētījumu parasti veic, izmantojot piecus tēviņus un piecas mātītes (vai piecus uzņēmīgā dzimuma dzīvniekus, ja tas ir zināms) katram koncentrācijas līmenim un vismaz trīs koncentrācijas līmeņus. Jāizmanto pietiekami koncentrācijas līmeņi, lai iegūtu drošu statistisku analīzi. Laika intervāls starp ekspozīcijas grupām ir atkarīgs no toksicitātes pazīmju parādīšanās, ilguma un smaguma. Nākamā koncentrācijas līmeņa iedarbībai dzīvnieki jāpakļauj tikai tad, kad gūta pietiekama pārliecība par iepriekšējā testā izdīvojušajiem dzīvniekiem. Tas pētījuma vadītājam dod iespēju koriģēt mērķkoncentrāciju nākamajai ekspozīcijas grupai. Tā kā inhalācijas pētījumos tiek izmantotas sarežģītas tehnoloģijas, tas ne vienmēr būs iespējams, tāpēc dzīvnieku pakļaušana nākamā koncentrācijas līmeņa iedarbībai jāpamato uz iepriekšējo pieredzi un zinātnisku loģiku. Testējot maisījumus, jāņem vērā GD 39 (2).

KONCENTRĀCIJA × LAIKS ($C \times t$) PROTOKOLS

Vispārīgi apsvērumi: $C \times t$ protokols

33. Inhalācijas toksicitātes vērtēšanā par tradicionālā protokola alternatīvu var uzskatīt $C \times t$ vairākpakāpju pētījumu (12) (13) (14). Šī pieeja ļauj dzīvniekus pakļaut testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai vairākos koncentrācijas līmeņos un ar vairākiem ilgumiem. Testus veic tikai deguna ekspozīcijas kamerā (visa ķermeņa ekspozīcijas kameras šim protokolam praktiski nav izmantojamas). Plūsmas diagramma 1. papildinājumā attēlo šo protokolu. Simulācijas analīze ir parādījusi, ka gan tradicionālais protokols, gan $C \times t$ protokols var nodrošināt uzticamas LC_{50} vērtības, bet $C \times t$ protokols parasti labāk spēj nodrošināt uzticamas LC_{01} un LC_{10} vērtības (15).
34. Simulācijas analīze ir parādījusi, ka divu dzīvnieku izmantošana katrā $C \times t$ intervālā (viens no katra dzimuma, ja izmanto abus dzimumus, vai divi no uzņēmīgākā dzimuma) parasti ir pietiekams skaits galvenajā pētījumā, kurā testē četrus koncentrācijas un piecus ekspozīcijas ilgumus. Dažos gadījumos pētījuma vadītājs var izvēlēties izmantot divas žurkas no katra dzimuma katrā $C \times t$ intervālā (15). Uz katru koncentrācijas un laika kombināciju izmantojot divus dzīvniekus no katra dzimuma, var mazināt aplēses sistēmātisko kļūdu un izkliedi, palielināt aplēses sekmīguma koeficientu un uzlabot ticamības intervāla segumu. Tomēr, ja pietiekami līdzīgi dati nav pieejami, noteikšanai (kurā izmanto vienu dzīvnieku no katra dzimuma vai divus no uzņēmīgākā dzimuma) var pietikt ar piekto ekspozīcijas koncentrāciju. Turpmāki norādījumi par $C \times t$ pētījumā izmantojamo dzīvnieku un koncentrāciju skaitu ir pieejamas GD 39 (2).

Devu diapazona pētījums: $C \times t$ protokols

35. Devu diapazona pētījumu izmanto, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas iedarbīgumu un lai labāk izraudzītos ekspozīcijas koncentrācijas līmeņus galvenajam pētījumam. Lai izvēlētos attiecīgu sākumkoncentrāciju galvenajam pētījumam un iespējami samazinātu izmantoto dzīvnieku skaitu, var būt vajadzīgs devu diapazona pētījums, izmantojot līdz trijiem dzīvniekiem/dzimumiem/koncentrācijām (sīkāka informācija pieejama GD 39 III papildinājumā (2)). Lai noteiktu atšķirības starp dzimumiem, var būt nepieciešams izmantot trīs dzīvniekus no katra dzimuma. Šie dzīvnieki ir jāpakļauj iedarbībai vienu ilgumu, parasti 240 minūtes. Tas, vai ir iespējams ģenerēt vajadzīgās testa atmosfēras, jānovērtē pirmstesta tehniskās testēšanas laikā bez dzīvniekiem. Ja mirstības dati ir pieejami no B.52. nodaļas pētījuma (4), devu diapazona pētījumu parasti nav vajadzīgs veikt. B.2. nodaļas pētījumā izvēloties sākotnējo mērķkoncentrāciju, pētījuma vadītājam ir jāņem vērā mirstības ainas, kas attiecībā uz abiem dzimumiem un visām testa koncentrācijām novērotas jebkādos pieejamos B.52. nodaļas pētījumos (4) (sk. GD 39 (2)).

Sākotnējā koncentrācija: $C \times t$ protokols

36. Sākotnējā koncentrācija (I ekspozīcijas seanss) (1. papildinājums) būs vai nu robežkoncentrācija, vai koncentrācija, ko izvēlēties pētījuma vadītājs, pamatojoties uz devu diapazona pētījumu. Grupas, kurā ir pa dzīvniekam no katra dzimuma, šīs koncentrācijas iedarbībai tiek pakļautas vairākus ilgumus (piemēram, 15, 30, 60, 120 vai 240 minūtes), tādējādi kopā izmantojot 10 dzīvniekus (I ekspozīcijas seanss) (1. papildinājums).
37. Robežkoncentrāciju izvēle parasti ir atkarīga no regulatīvajām prasībām. Ja piemēro Regulu (EK) Nr. 1272/2008, gāzu, tvaiku un aerosolu robežkoncentrācijas ir attiecīgi 20 000 ppm, 20 mg/l un 5 mg/l (vai maksimālā sasniedzamā koncentrācija) (3). Dažu testējamo ķīmisko vielu, it sevišķi tvaiku un aerosolu, robežkoncentrācijas var būt tehniski grūti ģenerēt. Testējot aerosolus, mērķim jābūt ieelpojama lieluma daļiņu iegūšanai (t. i., 1–4 μm MMAD) ar robežkoncentrāciju 2 mg/l. Ar lielāko daļu ķīmisko vielu tas ir iespējams. Testus ar aerosoliem koncentrācijā, kas pārsniedz 2 mg/l, drīkst veikt tikai tad, ja var iegūt ieelpojama lieluma daļiņas (sk. GD 39 (2)). Regulā (EK) Nr. 1272/2008 dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ iesaka izvairīties no testiem ar

koncentrācijām, kas pārsniedz robežkoncentrācijas (3). Vai neveikt testus ar koncentrācijām, kas pārsniedz robežkoncentrācijas, ir jāapsver tikai tad, ja ļoti iespējams, ka šāda testa rezultāti būtu tieši nozīmīgi cilvēku veselības aizsardzībai (3), un pētījuma ziņojumā tas jāpamato. Sprādzienbīstamu testējamo ķīmisko vielu gadījumā ir jācenšas izvairīties no apstākļiem, kuros var izraisīties sprādziens. Lai lieki neizmanto dzīvniekus, pirms testa ar sākotnējo koncentrāciju ir jāveic tests bez dzīvniekiem, nodrošinot, ka šādai koncentrācijai atbilstošie kameras apstākļi ir sasniedzami.

38. Ja ar sākotnējo koncentrāciju tiek novērota mirstība vai agonijas stāvoklis, rezultātus ar šo koncentrāciju var izmantot par devu sākumpunktu turpmākai testēšanai ar citām koncentrācijām (sk. galveno pētījumu). Ja testējamās ķīmiskās vielas fizikālās vai ķīmiskās īpašības neļauj sasniegt robežkoncentrāciju, tests jāveic ar maksimālo sasniedzamo koncentrāciju. Ja ar maksimālo sasniedzamo koncentrāciju mirstība nesasniedz 50 %, turpmāka testēšana nav vajadzīga. Ja robežkoncentrāciju sasniegt nav bijis iespējams, pētījuma ziņojumā jāsniedz paskaidrojums un pamatojoši dati. Ja maksimālā sasniedzamā tvaika koncentrācija nerada toksisku reakciju, var būt vajadzīgs ģenerēt testējamo ķīmisko vielu kā šķidru aerosolu.

Galvenais pētījums: $C \times t$ protokols

39. Galvenajā pētījumā testētā sākotnējā koncentrācija (I ekspozīcijas seanss) (1. papildinājums) būs vai nu robežkoncentrācija, vai koncentrācija, ko izvēlējies pētījuma vadītājs, pamatojoties uz devu diapazona pētījumu. Ja I ekspozīcijas seansa laikā vai pēc tās ir novērota mirstība, minimālā ekspozīcija ($C \times t$), kas izraisa mirstību, tiks uzskatīta par orientieri, pēc kura noteikt II ekspozīcijas seansa koncentrāciju un ekspozīcijas periodus. Katrs nākamais ekspozīcijas seanss būs atkarīgs no iepriekšējā seansa (sk. 1. papildinājumu).
40. Lai noteiktu $C \times t$ sakarību ar mirstību, daudzām testējamām ķīmiskajām vielām pietiks ar rezultātiem, kas iegūti ar sākotnējo koncentrāciju un papildus vēl trijos ekspozīcijas seansos ar smalkāku ilguma režģi (t. i., ekspozīcijas ilgumu ģeometriskais solis, ko raksturo ar koeficientu starp secīgiem ilgumiem (parasti $\sqrt{2}$) (15), bet dažus ieguvumus var dot piektās ekspozīcijas koncentrācijas izmantošana (sk. 1. papildinājumu un GD 39 (2)). Par $C \times t$ rezultātu matemātisko apstrādi sk. 1. papildinājumu.

NOVĒROJUMI

41. Ekspozīcijas perioda laikā dzīvnieki ir regulāri klīniski jānovēro. Pēc ekspozīcijas klīniskie novērojumi ekspozīcijas dienā jāveic vismaz divreiz vai biežāk, ja to indicē dzīvnieku reakcija uz vielas saņemšanu, un vismaz reizi dienā nākamās 14 dienas. Novērošanas perioda ilgums nav noteikts, bet tas ir jānosaka atkarībā no vērojamām klīniskajām pazīmēm, no to iestāšanās laika un no atveseļošanās perioda ilguma. Ir svarīgi, kādos laikos parādās un izzūd toksicitātes pazīmes, it sevišķi, ja to izpaušmei ir tendence aizkavēties. Visus novērojumus regulāri reģistrē, par katru dzīvnieku glabājot atsevišķus pierakstus. Visi mirstošie dzīvnieki un dzīvnieki, kam vērojamas lielu sāpju un/vai ilgstošu ciešanu pazīmes, dzīvnieku labturības nolūkos ir humāni jānonāvē. Veicot pārbaudes, lai pamanītu klīniskas toksicitātes pazīmes, ir jāuzmanās, lai sākotnējais savārgums un tādas pārejošas pārmaiņas elpošanā, kuru izraisījusi ekspozīcijas procedūra, netiktu kļūdaini uzskatītas par testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti, sakarā ar ko būtu vajadzīga dzīvnieku priekšlaicīga nonāvēšana. Jāņem vērā principi un kritēriji, kas apkopoti *Guidance Document on Humane Endpoints* (GD 19) (7). Ja dzīvnieki ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ vai atrasti miruši, iespējami precīzi ir jāreģistrē nāves iestāšanās laiks.
42. Novērojot dzīvniekus būros, ir jāpievērš uzmanība ādas un apmatojuma, acu un gļotādas, kā arī elpošanas, asinsrites, veģetatīvās un centrālās nervu sistēmas, somatomotorikas un uzvedības reakcijas pārmaiņām. Ja iespējams, uzmanība jāpievērš jebkādam atšķirībām starp lokālo un sistēmisko ietekmi. Jāpievērš uzmanība novērojumiem attiecībā uz drebuļiem, krampjiem, siekalošanos, caureju, letargiju, miegu un komu. Rektāli temperatūras mērījumi var nodrošināt papildu liecības par reflektorisku bradipnoju vai hipotermiju/hipertermiju, kas saistīta ar vielas saņemšanu vai kustību ierobežošanu.

Ķermeņa svars

43. Katra dzīvnieka svars ir jāreģistrē vienu reizi aklimatizēšanās periodā, ekspozīcijas dienā pirms ekspozīcijas (0. diena) un vismaz pirmajā, trešajā un septītajā dienā (un reizi nedēļā pēc tam), kā arī nāves vai eitanāzijas brīdī, ja tas notiek pēc pirmās dienas. Ķermeņa svaru uzskata par ļoti svarīgu toksicitātes pazīmi, tādēļ dzīvnieki, kam vērojams noturīgs ≥ 20 % dekrementis salīdzinājumā ar vērtībām, kuras iegūtas priekšizpētē, ir cieši jāmonitorē. Izzdīvojušos dzīvniekus nosver un humāni nonāvē pēckonspīcijas perioda beigās.

Patoloģija

44. Visiem testa dzīvniekiem, arī tiem, kas testa laikā nobeigušies vai kam dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ izdarīta eitanāzija un tie izņemti no pētījuma, ir jāveic pilna autopsija. Ja autopsiju nevar izdarīt tūlīt pēc mirušā dzīvnieka atklāšanas, dzīvnieks ir jāievieto ledusskapī (bez sasaldēšanas) temperatūrā, kas ir pietiekami zema, lai iespējami mazinātu autolīzi. Autopsijas jāveic iespējami drīz, parasti dienas vai divu dienu laikā. Par katru dzīvnieku ir jāreģistrē visas smagās patoloģiskās pārmaiņas, īpašu uzmanību pievēršot jebkādam pārmaiņām elpošanas sistēmā.

45. Lai paplašinātu pētījuma interpretējošo vērtību, var apsvērt, vai apriori neparedzēt papildu pārbaudes, piemēram, izdzīvojušo žurku plaušu svara noteikšanu un/vai tādas liecības par kairinājumu, ko gūst elpošanas sistēmas mikroskopiskā izmeklēšanā. Tāpat var izmeklēt tādos orgānus, kas liecina par smagām patoloģiskām pārmaiņām dzīvniekos, kuri izdzīvojuši 24 vai vairāk stundas, un orgānus, par ko ir zināms vai gaidāms, ka tie tiks skarti. Visas elpošanas sistēmas mikroskopiska izmeklēšana var nodrošināt lietderīgu informāciju par testējamām ķīmiskajām vielām, kas reaģē ar ūdeni, piemēram, skābēm un higroskopiskām testējamām ķīmiskām vielām.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

46. Ir jāsniedz dati par katra dzīvnieka svaru un autopsijas atradi. Klīnisko novērojumu dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot to dzīvnieku skaitu, kas izmantoti, to dzīvnieku skaitu, kuriem parādījušās noteiktas toksicitātes pazīmes, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā atrasti nobeigušies vai ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ, atsevišķu dzīvnieku nāves iestāšanās laiku, toksiskās ietekmes raksturu, norisi laikā un atgriezeniskumu, kā arī autopsijas atradi.

Testēšanas pārskats

47. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testa dzīvnieki un dzīvnieku turēšana:

- apraksts par turēšanu būros, arī par dzīvnieku skaitu (vai skaita maiņām) katrā būrī, pakaišiem, temperatūru un relatīvo mitrumu, apgaismojuma ilgumu un uzturu,
- izmantotās sugas/līnija un pamatojums, kādēļ ir izmantota cita suga, kas nav žurka,
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,
- nejaušības principa izvēles metode,
- sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti (ieskaitot uztura veidu/avotu, ūdens avotu),
- jebkāda pirmstesta sagatavošana, ieskaitot uzturu, karantīnu un slimības ārstēšanu.

Testējamā ķīmiskā viela:

- fizikālās īpašības, tīrība un attiecīgos gadījumos arī fizikālķīmiskās īpašības (ieskaitot izomerizāciju),
- identifikācijas dati un reģistrācijas numurs Ķīmijas referatīvajā žurnālā (CAS), ja zināms.

Nesējviela:

- nesējvielas izmantošanas pamatojums un nesējvielas izvēles pamatojums (ja tā nav ūdens),
- vēsturiski vai vienlaicīgi dati, kas pierāda, ka nesējviela neietekmē pētījuma rezultātu.

Inhalācijas kamera:

- inhalācijas kameras apraksts, ieskaitot izmērus un tilpumu,
- dzīvnieku ekspozīcijai un atmosfēras ģenerēšanai izmantotā aprīkojuma izcelsme un apraksts,
- temperatūras, mitruma, daļiņu lieluma un faktiskās koncentrācijas mērīšanas aprīkojums,

- gaisa avots un pievadītā/aizvadītā gaisa apstrāde, kā arī izmantotā kondicionēšanas sistēma,
- metodes, ko izmanto homogēnas testa atmosfēras nodrošināšanas aprīkojuma kalibrēšanai,
- spiediena starpība (pozitīva vai negatīva),
- ekspozīcijas portu skaits kamerā (deguna ekspozīcija); dzīvnieku atrašanās vieta sistēmā (visa ķermeņa ekspozīcija),
- testa atmosfēras īslaicīgā homogenitāte/stabilitāte,
- temperatūras un mitruma sensoru atrašanās vieta un testa atmosfēras paraugu ņemšana kamerā,
- gaisa caurplūduma rādītāji, gaisa caurplūdums uz vienu ekspozīcijas portu (deguna ekspozīcija) vai dzīvniek-slodze/kamera (visa ķermeņa ekspozīcija),
- attiecīgā gadījumā informācija par skābekļa un oglekļa dioksīda mērīšanai izmantoto aprīkojumu,
- laiks, kas vajadzīgs, lai inhalācijas kamerā sasniegtu līdzsvaru (t_{95}),
- tilpuma nomainītu skaits stundā,
- mērīšanas ierīces (attiecīgā gadījumā).

Ekspozīcijas dati:

- pamatojums par mērķkoncentrācijas izvēli galvenajam pētījumam,
- nominālās koncentrācijas (inhalācijas kamerā generētās testējamās ķīmiskās vielas kopējā masa, kas dalīta ar kamerai caurplūdušā gaisa tilpumu),
- testējamās ķīmiskās vielas faktiskās koncentrācijas, kas ievāktas no dzīvnieka inhalācijas zonas. Maisījumiem, kas veido heterogēnas fizikālās formas (gāzes, tvaiki, aerosoli), katru var analizēt atsevišķi,
- visas gaisa koncentrācijas pārskatā ir jānorāda masas vienībās (piemēram, mg/l, mg/m³ utt.) Iekavās var uzrādīt arī tilpuma vienības (piemēram, ppm, ppb utt.),
- daļiņu sadalījums pēc lieluma, masas vidējais aerodinamiskais diametrs (MMAD) un ģeometriskā standart-novirze (og), arī to aprēķināšanas metodes. Ziņojumā jāsniedz atsevišķu daļiņu lieluma analīzes.

Testēšanas apstākļi:

- sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas preparātu, ieskaitot informāciju par visām procedūrām, kas izmantotas cietu materiālu daļiņu lieluma samazināšanai vai testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu sagatavošanai. Gadījumos, kad mehāniski procesi ir, iespējams, mainījuši testējamās ķīmiskās vielas sastāvu, ziņojumā jāatspoguļo tādu analīžu rezultāti, kurās verificēts testējamās ķīmiskās vielas sastāvs,
- apraksts par iekārtu, ar kuru ģenerē testa atmosfēru un pakļauj dzīvniekus tās iedarbībai (vēlams, kopā ar shēmu),
- sīka informācija par izmantoto ķīmiski analītisko metodi un metodes validēšanu (ieskaitot to, cik efektīva ir testējamās ķīmiskās vielas atgūšana no paraugu ņemšanas vides),
- testa koncentrāciju izvēles pamatojums.

Rezultāti:

- tabula ar kameras temperatūru, mitrumu un gaisa plūsmu,
- tabula ar datiem par kameras nominālo un faktisko koncentrāciju,
- tabula ar datiem par daļiņu lielumu, ieskaitot analītisko paraugu ņemšanas datus, daļiņu lieluma sadalījuma un MMAD un σ_g aprēķinus,
- tabula ar datiem par katra dzīvnieka atbildes reakciju un koncentrācijas līmeni (t. i., dzīvnieki, kam izpaudušās toksicitātes pazīmes, arī mirstība; ietekmes veids, ietekmes smagums, sākumpunkts un ilgums),
- pētījuma dienās ievāktā informācija par katra dzīvnieka svaru, nāves datums un laiks, ja nāve iestājusies pirms paredzētās eitanāzijas, toksicitātes pazīmju parādīšanās gaita un par katru dzīvnieku norāde, vai šīs pazīmes bijušas atgriezeniskas,
- katra dzīvnieka autopsijas atrade un histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultāti, ja pieejami,
- mirstības aplēses (piemēram, LC₅₀, LD₀₁) ar ticamības robežu 95 % un sakarības slīpums (ja paredzēts izvērtēšanas metodē),
- statistiskais sakars, arī aplēses par pakāpes rādītāju n ($C \times t$ protokols). Jānorāda izmantotās statistiskās programmatūras nosaukums.

Rezultātu interpretācija un komentāri:

- īpaši svarīgi ir aprakstīt metodes, kas izmantotas, lai nodrošinātu, ka ir apmierināti šīs testa metodes kritēriji, piemēram, attiecībā uz robežkoncentrācijām vai daļiņu lielumu,
- ir jāapspriež daļiņu ieelpojamība, ņemot vērā kopējos konstatējumus, it sevišķi, ja nav izdevies nodrošināt atbilstību daļiņu lieluma kritērijiem,
- jāsniedz paskaidrojums, ja, pamatojoties uz ESAO *Guidance Document on Humane Endpoints* (8) kritērijiem, bija humāni jānonāvē dzīvnieki, kas cieta sāpes vai izrādīja smagu un ilgstošu ciešanu pazīmes,
- ja tests saskaņā ar šā pielikuma B.52. nodaļu (4) ticis pārtraukts, lai pārietu uz B.2. testēšanas metodi, tas jāpamato,
- pētījuma kopējā novērtējumā ir jānorāda nominālās un faktiskās koncentrācijas noteikšanai izmantoto metožu saskaņotība, kā arī faktiskās koncentrācijas attiecība pret nominālo,
- jāapspriež, kāds varētu būt nāves cēlonis un galvenais iedarbības veids (sistēmisks vai vietējs).

LITERATŪRA

- (1) OECD (2009). Acute Inhalation Toxicity Testing. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 403, OECD, Paris. Pieejams: <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. Pieejams: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- (3) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).
- (4) Šā pielikuma B.52. nodaļa "Akūtā inhalācijas toksicitāte: akūtās toksicitātes klases metode".

- (5) Šā pielikuma B.40. nodaļa "In vitro ādas erozija: transkutānās elektriskās pretestības (TEP) tests".
- (6) Šā pielikuma B.40.a nodaļa "Ādas erozijas in vitro tests: cilvēka ādas modeļa tests".
- (7) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method For Skin Corrosion. OECD Guideline for Testing of Chemicals No. 435, OECD, Paris. Pieejams: <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. Pieejams: <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.
- (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 × t Protocols via Simulation and for Selected Real Data Sets. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 104, OECD, Paris. Pieejams: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
- (16) Finney DJ (1977). Probit Analysis, 3rd ed. Cambridge University Press, London/New York.

DEFINĪCIJA

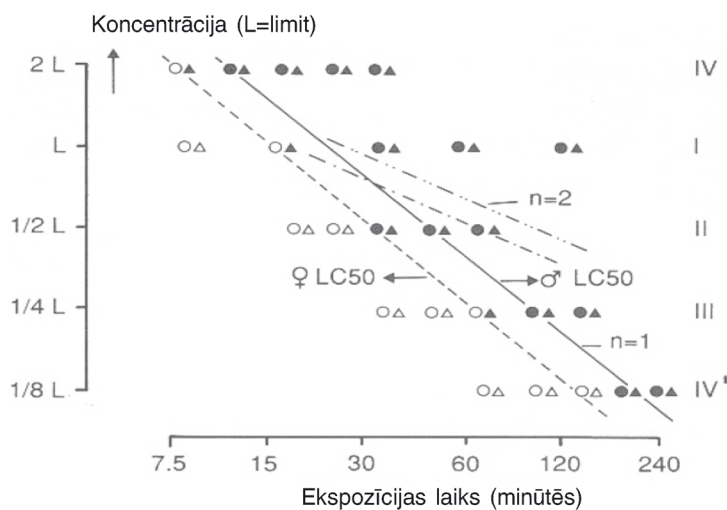
Testējamā ķīmiskā viela: jebkura viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

1. papildinājums

C × t protokols

1. Koncentrācija × laiks ($C \times t$) vairākpakāpju pētījumu var uzskatīt par tradicionālā protokola alternatīvu attiecībā uz inhalācijas toksicitātes novērtēšanu (12) (13) (14). To ir vēlams veikt gadījumā, kad konkrēta regulatīva vai zinātniska vajadzība (piemēram, plānošana attiecībā uz reaģēšanu ārkārtas situācijās vai zemes izmantošanas plānošana) nosaka, ka ir vajadzīga dzīvnieku testēšana ar vairākiem ekspozīcijas ilgumiem. Šo pieeju parasti sāk īstenot, veicot testu ar robežkoncentrāciju (I ekspozīcijas seanss) un pakļaujot dzīvniekus testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai piecos dažādos ilgumos (piemēram, 15, 30, 60, 120 un 240 minūtes), lai vienā ekspozīcijas seansā iegūtu vairākus ekspozīcijas ilgumus (sk. 1. attēlu). Ja piemēro Regulu (EK) Nr. 1272/2008, gāzu, tvaiku un aerosolu robežkoncentrācijas ir attiecīgi 20 000 ppm, 20 mg/l un 5 mg/l. Šos līmeņus drīkst pārsniegt tikai tad, ja regulatīva vai zinātniska vajadzība nosaka, ka testi jāveic ar augstākiem līmeņiem (sk. B.2. nodaļas pamatteksta 37. punktu).
2. Situācijās, kurās nepietiek vai vispār trūkst informācijas par testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu, jāveic devu diapazona pētījums, kur grupas ar ne vairāk kā trijiem katra dzimuma dzīvniekiem pakļauj pētījuma vadītāja izraudzītu mērķkoncentrāciju iedarbībai parasti 240 minūtes.
3. Ja I ekspozīcijas seansā testu veic ar robežkoncentrāciju un ja novērotā mirstība ir zem 50 %, papildu testi nav vajadzīgi. Ja regulatīva vai zinātniska vajadzība nosaka, ka koncentrācijas, laika un atbildes reakcijas sakarība ir jānosaka ar augstākiem līmeņiem nekā norādītā robežkoncentrācija, nākamā ekspozīcija jāveic ar augstāku līmeni, piemēram, divreiz augstāku par robežkoncentrāciju (t. i., 2L 1. attēlā).
4. Ja ar robežkoncentrāciju tiek novērota toksicitāte, ir vajadzīga papildu testēšana (galvenais pētījums). Šis papildu ekspozīcijas īsteno vai nu ar zemākām koncentrācijām (1. attēlā: II, III vai IV' ekspozīcijas seanss), vai ar augstākām koncentrācijām, izmantojot mazākus ilgumus (1. attēlā: IV ekspozīcijas seanss), kuri ir koriģēti un starp kuriem nav tik liels solis.
5. Testu (sākotnējā koncentrācija un papildu koncentrācijas) veic, izmantojot vienu dzīvnieku no katra dzimuma uz koncentrācijas/laika kombināciju vai divus uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus uz koncentrācijas/laika kombināciju. Dažos gadījumos pētījuma vadītājs var izvēlēties izmantot divas katra dzimuma žurkas uz koncentrācijas/laika kombināciju (vai četrus uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus uz koncentrācijas/laika kombināciju) (15). Katrai koncentrācijas un laika kombinācijai izmantojot divus dzīvniekus no katra dzimuma, attiecībā uz šeit aprakstīto protokolu mazinās aplēšu sistēmātiskā kļūda un izkliede, pieaug aplēses sekmīguma koeficients un uzlabojas ticamības intervāla segums. Papildu informācija ir sniegta GD 39 (2).
6. Katru ekspozīciju ir vēlams veikt vienas dienas ietvaros. Nākamā ekspozīcija jāveic tikai tad, kad ir gūta pietiekama pārliecība par izdzīvojušajiem dzīvniekiem, un tas pētījuma vadītājam dod iespēju koriģēt mērķkoncentrāciju un nākamās ekspozīcijas seansa ilgumu. Ieteicams katru ekspozīcijas seansu sākt ar grupu, kura iedarbībai tiks pakļauta visilgāko laiku, piemēram, 240 minūšu ekspozīcijas grupu, kam seko 120 minūšu ekspozīcijas grupa utt. Ja dzīvnieki, piemēram, 240 minūšu grupā, nobeidzas pēc 90 minūtēm vai tiem izpaužas smagas toksiskas iedarbības pazīmes (piemēram, ļoti izteiktas pārmaiņas elpošanā, piemēram, apgrūtināta elpošana), nebūtu nozīmes iedarbībai pakļaut 120 minūšu grupu, jo, visticamāk, tiktu novērota 100 % mirstība. Tādējādi pētījuma vadītājam šai koncentrācijai ir jāizvēlas mazāki ekspozīcijas ilgumi (piemēram, 90, 65, 45, 33 un 25 minūtes).
7. Koncentrācija kamerā ir regulāri jāmēra, lai katram ekspozīcijas ilgumam noteiktu laiciski svērto vidējo koncentrāciju. Kad vien iespējams, statistiskajā analizē ir jāizmanto katra dzīvnieka nāves iestāšanās laiks (nevis ekspozīcijas ilgums).
8. Lai identificētu datu nepārtrauktības pārrāvumu uz koncentrācijas un laika liknes (sk. 1. attēlu), ir jāanalizē pirmo četru ekspozīcijas seansu rezultāti. Ja dati nav pietiekami piemēroti, var veikt papildu ekspozīciju (5. koncentrācija). Koncentrācija un ekspozīcijas ilgumi 5. ekspozīcijai jāizvēlas tā, lai novērstu šo pārrāvumu.
9. Visus ekspozīcijas seansus (ieskaitot pirmo ekspozīcijas seansu) izmantos, lai aprēķinātu koncentrācijas, laika un atbildes reakcijas sakarību, izmantojot statistisko analīzi (16). Ja iespējams, katram $C \times t$ intervālam ir jāizmanto laiciski svērtā vidējā koncentrācija un ekspozīcijas ilgums līdz nāves brīdim (ja nāve iestājas ekspozīcijas laikā).

1. attēls

Koncentrācijas, laika un žurku mirstības sakarības hipotētisks attēlojums

Neiekrāsotie simboli = izdzīvojušie dzīvnieki; iekrāsotie simboli = nobeigušies dzīvnieki

Trīsstūri = mātītes; apli = tēviņi

Nepārtrauktā līnija = LC₅₀ vērtības (7,5–240 minūšu diapazonā) tēviņiem ar n = 1

Pārtrauktā līnija = LC₅₀ vērtības (7,5–240 minūšu diapazonā) mātītēm ar n = 1

Punktotā līnija = hipotētisko LC₅₀ vērtību līnija tēviņiem un mātītēm, ja n būtu bijis vienāds ar 2 (12)

Glosārijs

Koncentrācija:

Ekspozīcijas laiks:

10. Turpmāk sniegts vairākpakāpju procedūras piemērs.

I ekspozīcijas seanss. Testa veikšana ar robežkoncentrāciju (sk. 1. attēlu)

— 1 dzīvnieks no katra dzimuma uz koncentrācijas un laika kombināciju; kopā 10 dzīvnieki ^(a)

— Mērķkoncentrācija ^(b) = robežkoncentrācija

— Šīs mērķkoncentrācijas iedarbībai pakļauj piecas dzīvnieku grupas attiecīgi uz 15, 30, 60, 120 un 240 minūtēm

↓

II ekspozīcijas seanss ^(c). Galvenais pētījums

— 1 dzīvnieks no katra dzimuma uz koncentrācijas un laika kombināciju; kopā 10 dzīvnieki

^(a) Ja informācija par uzņēmību atkarībā no dzimuma nav pieejama, izmanto abu dzimumu žurkas, t. i., vienu dzīvnieku no katra dzimuma uz koncentrāciju. Pamatojoties uz esošo informāciju vai ja šā ekspozīcijas seansa laikā kļūst skaidrs, ka kāds no dzimumiem ir uzņēmīgāks, turpmākajā testā izmanto 10 uzņēmīgā dzimuma dzīvniekus (divus dzīvniekus uz koncentrācijas un ilguma kombināciju) katram koncentrācijas līmenim.

^(b) Ja piemēro Regulu (EK) Nr. 1272/2008, gāzu, tvaiku un aerosolu robežkoncentrācijas ir attiecīgi 20 000 ppm, 20 mg/l un 5 mg/l. Ja tiek prognozēts toksiskums vai ja to nosaka devu diapazona pētījuma rezultāti, jāizvēlas zemākas sākumkoncentrācijas. Ja to nosaka regulatīvas vai zinātniskas vajadzības, var izmantot augstākas koncentrācijas.

^(c) Nākamā koncentrācijas līmeņa iedarbībai dzīvniekus vēlamā pakļaut tikai tad, kad gūta pietiekama pārliecība par iepriekšējā testā izdzīvojušajiem dzīvniekiem. Tas pētījuma vadītājam dod iespēju koriģēt mērķkoncentrāciju un ilgumus nākamajam ekspozīcijas seansam.

- Zemākas koncentrācijas ^(d) (1/2L) iedarbībai pakļauj piecas dzīvnieku grupas ar nedaudz lielākiem ekspozīcijas ilgumiem (soļa koeficients $\sqrt{2}$; sk. 1. attēlu)

↓

III ekspozīcijas seanss. Galvenais pētījums

- 1 dzīvnieks no katra dzimuma uz koncentrācijas un laika kombināciju; kopā 10 dzīvnieki
- Zemākas koncentrācijas ^(d) (1/4L) iedarbībai pakļauj piecas dzīvnieku grupas ar nedaudz lielākiem ekspozīcijas ilgumiem (soļa koeficients $\sqrt{2}$; sk. 1. attēlu)

↓

IV' ekspozīcijas seanss. Galvenais pētījums

- 1 dzīvnieks no katra dzimuma uz koncentrācijas un laika kombināciju; kopā 10 dzīvnieki
- Zemākas koncentrācijas ^(d) (1/8L) iedarbībai pakļauj piecas dzīvnieku grupas ar nedaudz lielākiem ekspozīcijas ilgumiem (soļa koeficients $\sqrt{2}$; sk. 1. attēlu)

↓ vai

IV ekspozīcijas seanss. Galvenais pētījums

- 1 dzīvnieks no katra dzimuma uz koncentrācijas un laika kombināciju; kopā 10 dzīvnieki
- Augstākas koncentrācijas ^(e) (2L) iedarbībai pakļauj piecas dzīvnieku grupas ar nedaudz lielākiem ekspozīcijas ilgumiem (soļa koeficients $\sqrt{2}$; sk. 1. attēlu)

C × t protokola rezultātu matemātiskā apstrāde

11. C × t procedūra ar četrām vai piecām ekspozīcijas koncentrācijām un pieciem ilgumiem nodrošinās attiecīgi 20 vai 25 datu punktus. Ar šiem datu punktiem C × t sakarību var aprēķināt, izmantojot statistisko analīzi (16):

1. vienādojums:

$$\text{Probit}(P) = b_0 + b_1 \ln C + b_2 \ln t$$

kur C = koncentrācija; t = ekspozīcijas ilgums, vai

2. vienādojums:

$$\text{Atbildesreakcija} = f(C^n t)$$

kur $n = b_1 / b_2$.

Ar 1. vienādojumu var aprēķināt LC₅₀ vērtību attiecīgajam ilgumam (piemēram, 4 stundām, 1 stundai, 30 minūtēm vai jebkuram ilgumam testa ilgumu diapazonā), izmantojot P = 5 (50 % atbildes reakcija). Jāņem vērā, ka Hābera likums ir piemērojams tikai tad, ja n = 1. LC₀₁ var aprēķināt, izmantojot P = 2,67.

^(d) Atkarībā no minimālās devas (koncentrācija × laiks), kas izraisīja mirstību testā ar sākotnējo koncentrāciju (pirmajā ekspozīcijas seansā), izvēlas nākamā koncentrācijas un ekspozīcijas ilgumu kombināciju. Parasti koncentrāciju divreiz pazeminās (1/2L) un dzīvniekus pakļaus iedarbībai jaunā ilgumu diapazonā ar smalkāku režģi, kurā ģeometriskais koeficients starp ekspozīcijas ilgumiem ir 1,4 ($\sqrt{2}$; sk. 11. atsauci), un viduspunkts ir laiks, kādā pirmajā ekspozīcijā novērots zemākais letālās devas (laiks × koncentrācija) līmenis. Šajā attēlā (1. attēls) mirstību I ekspozīcijas seansā pirmo reizi novēroja 15. minūtē, tāpēc II seansā ilgumus centrēja ap 30 min, proti tie bija 15, 21, 30, 42 un 60 min. Pēc pirmajām divām ekspozīcijām ir ļoti ieteicams datus atspoguļot attēlā, kas līdzīgs iepriekšējam, un pārbaudīt, vai koncentrācijas un laika sakarības leņķis ir 45 grādi (n = 1) vai tomēr koncentrācijas, laika un atbildes reakcijas sakarības līkne ir mazāk stāva (piemēram, n = 2) vai stāvāka (piemēram, n = 0,8). Ja tā nav tik stāva vai ir stāvāka, ir ļoti ieteicams attiecīgi korigēt koncentrācijas un ilgumus.

^(e) Dažos gadījumos var būt nepieciešams palielināt koncentrāciju (2L) un mainīt ekspozīcijas ilgumu diapazonu, izmantojot vēl smalkāku režģi, kurā ģeometriskais koeficients starp blakus esošiem ilgumiem ir 1,4 ($\sqrt{2}$), un viduspunkts ir laiks, kādā pirmajā ekspozīcijā ir novērots zemākais letālās koncentrācijas līmenis. Vēlams, lai minimālais ekspozīcijas ilgums pārsniegtu piecas minūtes, bet maksimālais ilgums nepārsniegtu astoņas stundas.;

4) pielikuma B.7. un B.8. nodaļu aizstāj ar šādām:

“B.7. ATKĀRTOTAS DEVAS 28 DIENU ORĀLĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMS AR GRAUZĒJIEM

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 407 (2008. gads). Sākotnējos Testēšanas norādījumus 407 pieņēma 1981. gadā. Savukārt 1995. gadā pieņēma pārskatītu versiju, lai no pētījumā izmantota dzīvnieka iegūtu papildu informāciju, it sevišķi par neirotoksicitāti un imūntoksicitāti.
2. ESAO 1998. gadā uzsāka prioritāru rīcību, lai pārskatītu esošos testēšanas norādījumus un izstrādātu jaunus testēšanas norādījumus par potenciālu endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu un testēšanu (8). Viens no minētās rīcības elementiem bija esošo ESAO norādījumu “Atkārtotas devas 28 dienu orālās toksicitātes pētījums ar grauzējiem” (TG 407) atjaunināšana ar parametriem, kas būtu piemēroti, lai noteiktu testējamo ķīmisko vielu endokrīno aktivitāti. Šai procedūrai īstenoja plašu starptautisku programmu, lai pārbaudītu papildu parametru būtiskumu un praktisko piemērojamību, šo parametru lietderīgumu attiecībā uz ķīmiskām vielām ar (anti)estrogēnisku, (anti)androgēnisku un (anti)tireoidālu iedarbību, rezultātu atkārtojamību laboratorijā un starp laboratorijām un jauno parametru ietekmi uz parametriem, kuri bija noteikti iepriekšējos TG 407. Tādējādi iegūtie apjomīgie dati ir apkopoti un detalizēti novērtēti vispusīgā ESAO ziņojumā (9). Šī atjauninātā B.7. testēšanas metode (kas ir līdzvērtīga TG 407) ir starptautiskās testēšanas programmas pieredzes un rezultātu kopsavilkums. Šī testēšanas metode ļauj noteiktu endokrīni pastarpinātu iedarbību aplūkot citas toksikoloģiskas iedarbības kontekstā.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI UN IEROBEŽOJUMI

3. Pārbaudot un izvērtējot ķīmiskas vielas toksiskās īpašības, orālo toksicitāti ar atkārtotām devām var noteikt pēc tam, kad akūtās toksicitātes testos ir iegūta sākotnējā informācija par toksicitāti. Šīs testēšanas metodes mērķis ir izpētīt, kā tiek skarts organisms ļoti daudzveidīgos toksicitātes aspektos. Šī metode sagādā informāciju par iespējamiem veselības apdraudējumiem, ko varbūtīgi radīt atkārtotai ekspozīcijai relatīvi ierobežotā laikā, arī par ietekmi uz nervu sistēmu, imūnsistēmu un endokrīno sistēmu. Attiecībā uz šiem konkrētajiem beigupunktiem ar šo metodi ir jānosaka ķīmiskas vielas ar tādām neirotoksiskām īpašībām, kuru dēļ varētu būt nepieciešams padziļināti izpētīt šo aspektu, un ķīmiskas vielas, kas ietekmē vairogdziedzera fizioloģiju. Tāpat ar šo metodi var iegūt datus par ķīmiskām vielām, kas ietekmē jaunu pieaugušo dzīvnieku vīrišķos un/vai sievišķos reproduktīvos orgānus, kā arī norādes par imunoloģisku ietekmi.
4. Šīs B.7. testēšanas metodes rezultāti ir jāizmanto apdraudējuma noteikšanai un riska novērtēšanai. Rezultāti, par ko liecina ar endokrīno sistēmu saistīti parametri, ir jāaplūko ESAO *Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals* kontekstā (11). Metodē ietilpst atkārtotas devas toksicitātes pamatpētījums, ko var izmantot ķīmiskām vielām, kurām nav nepieciešams veikt 90 dienu pētījumu (piemēram, ja ražošanas apjoms nepārsniedz noteiktas robežas), vai par provizorisksu testu ilgtermiņa pētījumam. Ekspozīcijas ilgumam jābūt 28 dienām.
5. Starptautiskā programma, ko īstenoja, lai validētu parametrus, kuri būtu piemēroti testējamo ķīmisko vielu endokrīnās aktivitātes iespējamai noteikšanai, apliecināja, ka ar testēšanas metodi iegūto datu kvalitāte lielā mērā būs atkarīga no testēšanas laboratorijas pieredzes. Tas attiecas tieši uz ciklisko pārmaiņu histopatoloģisko noteikšanu mātišu reproduktīvajos orgānos un uz tādu nelielu hormonatkarīgu orgānu svara noteikšanu, kuru secēšana ir apgrūtināta. Ir izstrādāti norādījumi par histopatoloģiju (19). Tie ir pieejami ESAO publiskajā testēšanas norādījumu vietnē. To mērķis ir atbalstīt patoloģus pārbaūžu veikšanā un palīdzēt paaugstināt testa jutību. Tika konstatēti vairāki parametri, kas liecina par toksicitāti, kura saistīta ar endokrīno sistēmu, un šie parametri ir ietverti šajā testēšanas metodē. Parametrus, par kuriem pieejamie dati pietiekami nepierādīja to lietderību vai kuri validēšanas programmā sevišķi izteikti neliecināja par noderīgumu endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanā, ir ierosināts izmantot par neobligātiem beigupunktiem (sk. 2. papildinājumu).
6. Pamatojoties uz validēšanas procesā iegūtajiem datiem, jāuzsver, ka šī testa jutība nav pietiekama, lai noteiktu visas vielas ar (anti)estrogēnisku un (anti)androgēnisku iedarbību (9). Testēšanas metodi neīsteno tādā mūža posmā, kad jutība pret endokrīnās sistēmas traucējumiem ir visaugstākā. Tomēr validēšanas procesa laikā ar šo testēšanas metodi konstatēja vielas, kas vāji vai stipri ietekmē vairogdziedzera darbību, kā arī stipri un mēreni endokrīni aktīvas vielas, kas iedarbojas ar estrogēnu vai androgēnu receptoru starpniecību, bet lielākajā daļā gadījumu nespēja konstatēt endokrīni aktīvas vielas, kas vāji ietekmē estrogēnu vai androgēnu receptorus. Tādēļ to nevar uzskatīt pat endokrīnās aktivitātes noteikšanas testu.
7. Tas, ka šādas iedarbības sekas neizpaužas, vēl neliecina, ka iedarbība uz endokrīno sistēmu nenotiek. Tāpēc attiecībā uz endokrīni pastarpinātu iedarbību vielas raksturošanu nedrīkst balstīt uz šīs testēšanas metodes rezultātiem vien, tie ir jāizmanto uz apliecinājumiem balstītā pieejā, iespējamās endokrīnās aktivitātes raksturošanai apkopojot visus esošos datus par konkrēto ķīmisko vielu. Iepriekš aprakstītā iemesla dēļ regulatīviem lēmumiem par endokrīno aktivitāti (vielās raksturošana) jābalstās uz plašu pieeju, nevis tikai šīs testēšanas metodes piemērošanas rezultātiem.

8. Ir atzīts, ka visām procedūrām, kurās izmanto dzīvniekus, ir jāatbilst vietējiem dzīvnieku labturības standartiem. Turpmāk ir izklāstīti labturības un testu obligātie standarti, kurus aizstāj vietējie noteikumi, ja tie ir stingrāki. Papildu norādījumus par humānu attieksmi pret dzīvniekiem ir sniegusi ESAO (14).
9. Definīcijas dotas 1. papildinājumā.

TESTA PRINCIPS

10. Testējamo ķīmisko vielu pakāpeniski pieaugošās devās katru dienu orāli ievada vairākām eksperimenta dzīvnieku grupām, vienu devas līmeni katrai grupai 28 dienu periodā. Vielas ievadīšanas laikā katru dienu rūpīgi novēro, vai dzīvniekiem neparādās toksicitātes pazīmes. Dzīvniekiem, kas nobeidzas vai ko eitanazē testa laikā, izdara autopsiju, un testa beigās izdzīvojušos dzīvniekus eitanazē, un arī tiem izdara autopsiju. 28 dienu pētījums sniedz informāciju par atkārtotas orālas ekspozīcijas iedarbību un var norādīt uz nepieciešamību veikt turpmākus ilgtermiņa pētījumus. Tas var arī sniegt informāciju par koncentrāciju izvēli ilgāka termiņa pētījumiem. No šīs testēšanas metodes izmantošanas iegūtajiem datiem jānodrošina iespēja raksturot testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti, norādīt devas un atbildes reakcijas sakarību un noteikt nenovērojamās nelabvēlīgās ietekmes līmeni (NOAEL).

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

11. Ieteicamā grauzēju suga ir žurka, bet var izmantot citas grauzēju sugas. Ja šajā B.7. testēšanas metodē noteiktie parametri tiek pētīti citās grauzēju sugās, tas sīki jāpamato. Lai gan bioloģiski ir iespējams, ka citas sugas uz toksiskajām vielām reaģēs līdzīgi žurkām, mazāku sugu izmantošana var palielināt mainību, jo mazāku orgānu secēšana ir tehniski sarežģīta. Starptautiskajā validēšanas programmā endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanai izmantoja tikai žurkas. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši dzīvnieki, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Devu došana jāsāk iespējami drīz pēc tam, kad dzīvniekus beigts zīdīt, un noteikti pirms tie sasnieguši deviņu nedēļu vecumu. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt $\pm 20\%$ no katra dzimuma vidējā svara. Ja atkārtotas devas orālo pētījumu veic kā ilgāka termiņa pētījuma provizorisko testu, vēlams abus pētījumos izmantot vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekus.

Turēšana un barošana

12. Visām procedūrām ir jāatbilst vietējiem laboratorijas dzīvnieku labturības standartiem. Temperatūrai telpās, kurās tur eksperimenta dzīvniekus, jābūt 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30% un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams, ne vairāk par 70% , jācenšas nodrošināt mitrumu $50\text{--}60\%$ robežās. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Uztura izvēli var ietekmēt vajadzība nodrošināt piemērotu testējamās ķīmiskās vielas piejaukšanu, ja vielu ievada ar šādu metodi. Dzīvniekus vajadzētu turēt nelielās viendzimuma grupās. Ja tas ir zinātniski pamatoti, dzīvniekus var turēt atsevišķi. Turot dzīvniekus grupās, skaits vienā būrī nedrīkstētu pārsniegt 5.
13. Barība ir regulāri jāanalizē, lai noteiktu piesārņotāju klātbūtni. Barības paraugs ir jāglabā līdz ziņojuma pabeigšanai.

Dzīvnieku sagatavošana

14. Veselus un jaunus pieaugušos dzīvniekus nejaušināti sadala kontroles un testa grupās. Būrus izvieto tā, lai iespējami samazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Dzīvniekiem piešķir unikālu identifikāciju un līdz testa sākumam tos vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

Devu sagatavošana

15. Testējamo ķīmisko vielu ievada ar mākslīgo barošanu vai ar uzturu vai dzeramo ūdeni. Orālās ievadīšanas metode ir atkarīga no pētījuma mērķa un no testējamās ķīmiskās vielas fizikālajām/ķīmiskajām/toksiskajām un kinētiskajām īpašībām.
16. Ja vajadzīgs, testējamo ķīmisko vielu izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējvielā. Ir ieteicams, ja vien iespējams, vispirms apsvērt ūdens šķīduma/suspensijas izmantošanu, pēc tam eļļas (piemēram, kukurūzas eļļas) šķīdumu/suspensiju un pēc tam iespējamu šķīdināšanu citās nesējvielās. Ja nesējviela nav ūdens, ir jāzina šīs nesējvielas toksiskās īpašības. Ir jānosaka testējamās ķīmiskās vielas stabilitāte nesējvielā.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

17. Katram devas līmenim jāizmanto vismaz 10 dzīvnieki (piecas mātītes un pieci tēviņi). Ja dzīvnieku eitanāzija paredzēta arī testa laikā, to skaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kurus paredzēts eitanazēt pirms pētījuma pabeigšanas. Jāapsver iespēja izmantot papildu 10 dzīvnieku satelītgrupas (pieci no katra dzimuma) iekļaušanu kontrolgrupā un lielākās devas grupā, lai vismaz 14 dienas pēc vielas ievadīšanas novērotu toksiskās iedarbības atgriezeniskumu, noturību vai aizkavētu parādīšanos.

Dozējums

18. Parasti ir jāizmanto vismaz trīs testa grupas un viena kontrolgrupa, bet, ja no pieejamajiem datiem izriet, ka 1 000 mg/kg bw/d deva nekādu iedarbību neradīs, var veikt pieļaujamā daudzuma testu. Ja piemēroti dati nav pieejami, var izdarīt diapazona noteikšanas pētījumu (ar vienas līnijas un izcelsmes dzīvniekiem), kas palīdzētu noteikt izmantojamās devas. Ar kontrolgrupas dzīvniekiem jārikojas tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem, tie tikai nesaņem testējamo ķīmisko vielu. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada kopā ar nesējvielu, kontrolgrupa saņem maksimālo izmantoto nesējvielas daudzumu.
19. Devu līmeņi jāizvēlas, ņemot vērā esošos toksicitātes un toksikokinētiskos vai kinētiskos datus, kas ir pieejami par testējamo ķīmisko vielu vai tai radniecīgajām ķīmiskajām vielām. Augstākais devas līmenis ir jāizvēlas ar mērķi izraisīt toksisku iedarbību, bet ne nobeigšanos vai smagas ciešanas. Pēc tam jāizvēlas devu līmeņi tādā lejupejošā secībā, lai pierādītu jebkādas ar devām saistītas atbildes reakcijas un zemāko devas līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme (NOAEL). Lejupejošo devu līmeņu noteikšanai bieži optimāli ir divkārti līdz četrkārti intervāli, un nereti ir ieteicamāks pievienot ceturto testa grupu, nevis izmantot ļoti lielus intervālus (piemēram, pārsniedzot koeficientu 10) starp devu došanu.
20. Ja ir novērota vispārīga toksiska reakcija (piemēram, samazināts ķermeņa svars, ietekme uz aknām, sirdi, plaušām vai nierēm utt.) vai citas pārmaiņas, kas var nebūt toksiskas atbildes reakcijas (piemēram, samazināts barības patēriņš, aknas palielināšanās), ir jābūt piesardzīgiem, interpretējot novēroto iedarbību uz imunoloģiskajiem, neiroloģiskajiem vai endokrīnajiem beigupunktiem.

Pieļaujamā daudzuma tests

21. Ja, izdarot testu vienā devas līmenī, kas ir vismaz 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā vai – attiecībā uz vielu, kas ievadīta ar uzturu vai dzeramo ūdeni, – līdzvērtīgs procentuālais daudzums uzturā vai dzeramajā ūdenī (aprēķināts pēc noteiktajiem ķermeņa svariem) un izmantojot šim pētījumam paredzētās procedūras, novērojama toksiska ietekme nerodas un ja, pamatojoties uz datiem par strukturāli radniecīgām vielām, toksicitāte nav paredzama, var uzskatīt, ka pilns pētījums ar trīs devu līmeņiem nav vajadzīgs. Izņemot gadījumu, kur iedarbība uz cilvēku norāda, ka jāizmanto augstāks devas līmenis, piemēro pieļaujamā daudzuma testu.

Devu ievadīšana

22. Testējamo ķīmisko vielu dzīvniekiem dod ik dienu septiņas dienas nedēļā 28 dienu ilgā laikā. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar mākslīgo barošanu, viela ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli dzīvniekiem jāievada vienreizējā devā. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testējamā dzīvnieka lieluma. Tilpums nedrīkst pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara, izņemot ūdens šķidrumus, kad var lietot 2 ml uz 100 g ķermeņa svara. Izņemot kairinošas vai kodīgas ķīmiskās vielas, kuru iedarbība lielākās koncentrācijās parasti ir izteiktāka, ir iespējami jāsamazina testā lietotā tilpuma mainība, koriģējot koncentrāciju tā, lai ar visiem devu līmeņiem tilpums būtu vienāds.
23. Ir svarīgi nodrošināt, lai ķīmiskajām vielām, kuras ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni, testējamās ķīmiskās vielas daudzumi neizjauktu parasto uztura vai ūdens līdzsvaru. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, var izmantot nemainīgu koncentrāciju uzturā (ppm) vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru. Ir jānorāda izmantotā alternatīva. Ja ķīmisko vielu ievada ar mākslīgo barošanu, deva katru dienu jāievada līdzīgā laikā un pēc vajadzības jākorrigē, lai uzturētu nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru. Ja atkārtotas devas pētījumu izmanto par ilgtermiņa pētījuma provizorisks testu, abos pētījumos jāizmanto tāds pats uzturs.

Novērojumi

24. Novērošanas periodam jābūt 28 dienām. Satelītgrupas dzīvnieki, kam paredzēti papildu novērojumi, ir jātur vismaz 14 dienas bez vielas saņemšanas, lai noteiktu toksiskas ietekmes aizkavētu parādīšanos, noturību vai izveseļošanos no tās.
25. Vismaz reizi dienā ir jāizdara vispārīgi kliniski novērojumi, vēlams, vienādos laikos katru dienu, ņemot vērā paredzamās ietekmes maksimuma laiku pēc vielas došanas. Dzīvnieku veselības stāvoklis ir jāreģistrē. Vismaz divreiz dienā visus dzīvniekus novēro attiecībā uz saslimstību un mirstību.

26. Vienu reizi pirms pirmās ekspozīcijas (lai varētu izdarīt salīdzināšanu vienam un tam pašam dzīvniekam) un pēc tam vismaz reizi nedēļā jāveic detalizēti klīniskie novērojumi visiem dzīvniekiem. Šie novērojumi jāizdara ārpus dzīvnieka turēšanas būra standartnožogojumā, ieteicams, katru reizi vienā un tajā pašā dienas laikā. Novērojumi ir rūpīgi jāreģistrē, vēlams, izmantojot vērtēšanas sistēmu, ko skaidri noteikusi testēšanas laboratorija. Ir jācenšas nodrošināt, lai testēšanas apstākļu mainība būtu minimāla un lai novērošanu izdarītu novērotāji, kas nav informēti par vielas ievadīšanu. Protokolējamās pazīmēs jāiekļauj (bet ne tikai) pārmaiņas ādā, apmatojumā, acīs, gļotādā, sekrēcija un izdalījumi, kā arī veģetatīvā aktivitāte (piemēram, asarošana, piloarekcija, acs zīlītes diametrs un neraksturīga elpošana). Jāreģistrē arī pārmaiņas gaitā, stājā un atbildes reakcijās uz manipulācijām, kā arī klonisko un tonisko kustību klātesamība, stereotipiska (piemēram, pārmērīga apmatojuma laizīšana, atkārtota riņķošana) vai savāda uzvedība (piemēram, sakropļošanās, staigāšana at muguriski) (2).
27. Ceturtajā ekspozīcijas nedēļā ir jānovērtē sensoriskās reakcijas uz dažāda veida (2) kairinājumiem (piemēram, dzirdes, redzes un proprioceptīvajiem kairinātājiem) (3) (4) (5), kā arī jānovērtē satveršanas stiprums (6) un motoriskā aktivitāte (7). Sīkāki dati par procedūrām, kuras var izmantot, ir sniegti attiecīgajos atsauču avotos. Tomēr var izmantot alternatīvas procedūras, nevis tikai tās, kuras minētas atsauču avotos.
28. Funkcionālos novērojumus, kurus veic 4. ekspozīcijas nedēļā, var neveikt, ja pētījumu veic kā turpmāka subhroniskās toksicitātes (90 dienu) pētījuma provizorisko pētījumu. Tādā gadījumā funkcionālie novērojumi ir jāiekļauj šajā turpmākajā pētījumā. Tomēr atkārtotas devas pētījumā iegūtie funkcionālo novērojumu dati var atvieglot devu līmeņu izvēli turpmākajam subhroniskās toksicitātes pētījumam.
29. Izņēmuma gadījumos funkcionālos novērojumus var arī neveikt tām dzīvnieku grupām, kurām arī bez šādiem novērojumiem izpaužas tādas toksicitātes pazīmes, kas ievērojami traucētu funkcionālā testa norisi.
30. Veicot autopsiju, visām mātītēm pēc vaginālajām uztriepēm var noteikt (pēc izvēles) estrālo ciklu. Šie novērojumi nodrošinās informāciju par estrālā cikla posmu nonāvēšanas laikā un palīdzēs histoloģiski izvērtēt pret estrogēniem jutīgus audus (sk. norādījumus par histopatoloģiju (19)).

Kermeņa svars un barības/ūdens patēriņš

31. Visi dzīvnieki jānosver vismaz reizi nedēļā. Barības patēriņa mērījumi ir jāizdara vismaz reizi nedēļā. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar dzeramo ūdeni, arī ūdens patēriņš ir jāmēra vismaz reizi nedēļā.

Hematoloģija

32. Testa laika beigās ir jāizdara šādi hematoloģiskie izmeklējumi: hematokrīts, hemoglobīna koncentrācijas, eritrocītu skaits, retikulocīti, leikocītu kopējais un diferenciālais skaits, trombocītu skaits un asins recēšanas laiks/spēja. Ja testējamajai ķīmiskajai vielai vai tās vispārpieņemtiem metabolītiem ir vai varētu būt oksidējošas īpašības, jānosaka arī methemoglobīna koncentrācija un Heinca ķermenīši.
33. Asins paraugi jāņem no precīzi norādītas vietas tieši pirms dzīvnieku eitanāzijas procedūras vai tās laikā un jāglabā piemērotos apstākļos. Pirms eitanāzijas dzīvniekus iepriekšējā naktī nebaro ⁽¹⁾.

Klīniskā bioķīmija

34. Klīniski bioķīmiskā noteikšana, kurā pēta būtisku toksisko ietekmi uz audiem un, konkrētāk, ietekmi uz nierēm un aknām, jāveic ar tiem asins paraugiem, kuri paņemti no katra dzīvnieka tieši pirms dzīvnieka eitanāzijas vai tās laikā (tas neattiecas uz dzīvniekiem, kuri atrasti mirsotī un/vai eitanazēti pirms pētījuma beigām). Plazmā vai serumā nosaka nātriju, kāliju, glikozi, kopējo holesterīnu, urīnvielu, kreatinīnu, kopējo olbaltumu un albumīnu un vismaz divus fermentus, kas norāda uz hepatocelulāro ietekmi (piemēram, alanīna aminotransferāze, aspartāta aminotransferāze, alkalīnfosfatāze, γ-glutamiltanspeptidāze un glutamīna dehidrogenāze), kā arī žultsskābes. Noteiktos apstākļos noderīgu informāciju var sniegt papildu fermentu (aknu fermentu vai citu fermentu) un bilirubīna noteikšana.
35. Pēdējā pētījuma nedēļā pēc izvēles var izdarīt šādas urīnanalīzes, izmantojot urīna savākšanu iepriekš noteiktā laika periodā: izskats, tilpums, osmolalitāte vai īpatnējais svars, pH, olbaltumvielas, glikoze un asinis/asins šūnas.

⁽¹⁾ Dažiem mērījumiem serumā un plazmā, jo īpaši glikozes mērījumiem, ir vēlams dzīvniekiem pirms asins ņemšanas uz nakti nedot barību. Tas ieteicams galvenokārt tāpēc, ka barības uzņemšana neizbēgami paaugstinātu mainību, tādējādi drīzāk maskējot vāji izteiktu iedarbību un apgrūtinot interpretāciju. Tomēr barības nedošana uz nakti var traucēt dzīvnieku vispārējo vielmaiņu un – jo īpaši barošanas pētījumos – var izjaukt testējamās ķīmiskās vielas parasto iedarbību. Ja tiek izlemts dzīvniekus uz nakti atstāt bez barības, klīniskie bioķīmiskie mērījumi jāveic pēc pētījuma funkcionālo novērojumu izdarīšanas ceturtajā nedēļā.

36. Turklāt jāapsver, vai neveikt pētījumus par audu vispārīgu bojājumu marķieriem plazmā vai serumā. Ja testējamās ķīmiskās vielas zināmās īpašības ietekmē vai varētu ietekmēt attiecīgos metaboliskos profilus, jānoteic kalcijš, fosfāti, triglicerīdi, atsevišķi hormoni un holīnesterāze. Šie faktori ir jānosaka konkrētu klašu ķīmiskajām vielām vai katrā gadījumā atsevišķi.

37. Lai gan starptautiskā izvērtēšanā par beigupunktiem, kas saistīti ar endokrīno sistēmu, nevarēja pierādīt, ka tos būtu izdevīgi izmantot vairogdziedzera hormonu (T3, T4) un TSH noteikšanā, ja ir liecības par ietekmi uz hipofīzes un vairogdziedzera asi, varētu būt lietderīgi saglabāt plazmas vai seruma paraugus, lai varētu izmērīt T3, T4 un TSH (nav obligāti). Šos paraugus uzglabāšanas nolūkos var sasaldēt – 20 °C. Turpmāk norādītie faktori var ietekmēt noteikto hormonu mainību un absolūtās koncentrācijas:

— nonāvēšanas laiks hormonu koncentrāciju diennakts mainības dēļ,

— nonāvēšanas metode – dzīvniekiem nav jārada nevajadzīgs stress, kurš varētu ietekmēt hormonu koncentrācijas,

— hormonu noteikšanas komplekti, kas var atšķirties pēc standarta līknēm.

Vairogdziedzera aktīvo ķīmisko vielu galīgā noteikšana ir ticamāka ar histopatoloģisko analīzi, nevis pēc hormonu līmeņiem.

38. Plazmas paraugi, kas paredzēti tieši hormonu noteikšanai, ir jāiegūst salīdzināmā dienas laikā. Ieteicams apsvērt iespēju noteikt T3, T4 un TSH, pamatojoties uz histopatoloģiski konstatētām vairogdziedzera pārmaiņām. Skaitliskās vērtības, ko iegūst, analizējot hormonu koncentrācijas, atšķiras atkarībā no tirdzniecībā pieejamajiem testēšanas komplektiem. Tādējādi var nebūt iespējams nodrošināt tādu snieguma kritērijus, kuru pamatā ir vienoti vēsturiski dati. Tā vietā laboratorijām jācenšas nodrošināt, ka T3 un T4 mainības kontroles koeficienti nepārsniedz 25, savukārt TSH – 35. Visas koncentrācijas ir jāreģistrē, izsakot tās ng/ml.

39. Ja vēsturiskie izejdati ir nepietiekami, jāapsver iespēja noteikt hematoloģiskos un klīniski bioķīmiskos mainīgos lielumus pirms devu došanas sākšanas vai, ieteicams, dzīvniekiem, kas nav ietverti eksperimentālajās grupās.

PATOLOĢIJA

Pilna autopsija

40. Visiem pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem veic pilnu, detalizētu autopsiju, ieskaitot ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa dobumu, torakālā dobuma, vēdera dobuma, kā arī šo dobumu satura rūpīgu apskati. Visu dzīvnieku (tas neattiecas uz dzīvniekiem, kas atrasti mirstoši un/vai eitanazēti pirms pētījuma beigām) aknas, nieres, virsnieru dziedzeri, sēklinieki, sēklinieku piedēkļi, prostata un sēklas pūslīši kopā ar koagulācijas dziedzeri, tīms, liesa, smadzenes un sirds ir jāatbrīvo no visiem apkārtējiem audiem, un, lai izvairītos no izžūšanas, iespējami drīz pēc secēšanas jānoteic to natīvais svars. Atbrīvojot no audiem prostatu, ir jāuzmanās, lai nepārspiestu ar šķidrumu pildītos sēklas pūslīšus. Sēklas pūslīšus un prostatu var arī atbrīvot no audiem un nosvērt pēc fiksācijas.

41. Vēl divus cita veida audus var pēc izvēles nosvērt iespējami drīz pēc secēšanas, lai izvairītos no izžūšanas: abas olnīcas (natīvais svars) un dzemdi, arī dzemdes kaklu (norādījumi par dzemdes audu izņemšanu un sagatavošanu nosvēršanai ir sniegti ESAO TG 440 (18)).

42. Vairogdziedzera svaru (pēc izvēles) var noteikt pēc fiksācijas. Tas jāatbrīvo no audiem ļoti uzmanīgi un tikai pēc fiksācijas, lai audus nesabojātu. Audu bojājumi var apgrūtināt histopatoloģijas analīzi.

43. Fiksācijas šķīdumā, kas ir vispiemērotākais gan konkrētā veida audiem, gan paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai (sk. 47. punktu), ir jā saglabā turpmāk minētie audi: visi audi ar makroskopiskiem bojājumiem, smadzenes (reprezentatīvi apgabali, tostarp lielās smadzenes, smadzenītes un iegarenās smadzenes / smadzeņu tilts), muguras smadzenes, acis, kuņģis, tievās un resnās zarnas (arī kopu limfātiskie jeb Peijera mezgliņi), aknas, nieres, virsnieru dziedzeri, liesa, sirds, tīms, vairogdziedzeris, traheja un plaušas (konservētas, piepūšot ar fiksācijas šķīdumu un pēc tam iegremdējot), gonādas (sēklinieki un olnīcas), papildu dzimumorgāni (dzemde un dzemdes kakls, sēklinieku piedēkļi, prostata un sēklas pūslīši kopā ar koagulācijas dziedzeri), maksts, urīnpūslis, limfmezgli (saskaņā ar laboratorijas pieredzi papildus proksimālam drenējošam limfmezglam ir jāņem vēl viens limfmezgls (15)), perifērais nervs (sēžas nervs vai tibiālais nervs), vēlams, tiešā muskuļa tuvumā, skeleta muskuli un kauls ar kaula smadzenēm (izgriezumš vai, alternatīvi, svaigs kaula smadzeņu aspirāts). Ieteicama sēklinieku fiksācija, tos iegremdējot Buina fiksācijas šķīdumā vai Davidsona modificētā fiksācijas šķīdumā (16) (17). Bālganais apvalks ir uzmanīgi un sekli jāpārdur ar adatu abos orgāna galos, lai fiksācijas šķīdums varētu tajā ātri iekļūt. Jā saglabā arī orgāni, ko, pamatojoties uz zināmām testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, uzskata par iespējamiem mērķorgāniem.

44. Vērtīgas norādes par endokrīnu iedarbību var gūt no šādiem audiem: gonādas (olnīcas un sēklinieki), papildu dzimumorgāni (dzemde un dzemdes kakls, sēklinieku piedēkļi, sēklas pūslīši ar koagulācijas dziedzeri, muguras un vēdera prostata), maksts, hipofīze, tēviņu krūts dziedzeris, vairogdziedzeris un virsnieru dziedzeris. Tēviņu krūts dziedzeru pārmaiņas nav pietiekami dokumentētas, taču šis parametrs var būt ļoti jutīgs pret vielām ar estrogēnisku iedarbību. To orgānu/audu novērojumi, kas nav uzskaitīti 43. punktā, nav obligāti (sk. 2. papildinājumu).
45. Norādījumos par histopatoloģiju (19) ir sīki izklāstīta papildu informācija par endokrīno audu secēšanu, fiksāciju un histopatoloģiju.
46. Starptautiskajā testēšanas programmā tika iegūts apliecinājums tam, ka neizteiktu endokrīno ietekmi, ko rada ķīmiskās vielas ar zemu spēju ietekmēt dzimumhormonu homeostāzi, var labāk noteikt pēc estrālā cikla sinhronizācijas traucējumiem dažādos audos, nevis histopatoloģiski konstatētām mātīšu dzimumorgānu pārmaiņām. Lai gan galīgi pierādījumi par šādu iedarbību netika iegūti, interpretējot olnīcu (folikulārās šūnas, teka šūnas un granulozās šūnas), dzemdes, dzemdes kakla un maksts histopatoloģiju, ir ieteicams ņemt vērā liecības par estrālā cikla iespējamu asinhroniju. Ja tās tiek novērtētas, šajā salīdzinājumā varētu aplūkot arī cikla posmus, kas noteikti ar vaginālajām uztriepēm.

Histopatoloģija

47. Visu kontrolgrupas un lielāko devu grupu dzīvnieku saglabātajiem orgāniem un audiem ir jāizdara pilna histopatoloģiskā izmeklēšana. Ja lielākās devas grupā ir novērotas ar vielas saņemšanu saistītas pārmaiņas, minētā izmeklēšana jāveic visu citu devu grupu dzīvniekiem.
48. Jāizmeklē visi makroskopiskie bojājumi.
49. Ja izmanto satelītgrupu, histopatoloģiskā izmeklēšana jāizdara audiem un orgāniem, uz kuriem vielu saņēmušajās grupās ir konstatēta ietekme.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

50. Jānorāda dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, attiecībā uz katru testa grupu norādot dzīvnieku skaitu testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kas testa laikā ir nobeigušies vai humānu apsvērumu dēļ eitanazēti, un katras nobeigšanās vai eitanāzijas laiku, to dzīvnieku skaitu, kam novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju aprakstu, ieskaitot toksiskās ietekmes sākuma laiku, ilgumu un smagumu, to dzīvnieku skaitu, kam novēroti audu bojājumi, bojājumu veidus, to smagumu un to dzīvnieku procentuālo īpatsvaru, kuriem parādījušies katra tipa bojājumi.
51. Ja iespējams, skaitliskie rezultāti jānovērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistikas metodi. Dažādu diapazona devu ietekmes salīdzināšanā jāizvairās no vairāku ilgumu testiem. Statistiskās metodes ir jāizvēlas pētījuma plānošanas laikā.
52. Lai kontrolētu kvalitāti, ir ierosināts apkopot vēsturiskus kontrolstatus un skaitliskajiem datiem, it sevišķi parametriem, kas saistīti ar endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītāju noteikšanu, aprēķināt variācijas koeficientus. Šos datus var izmantot salīdzināšanas nolūkos, kad tiek novērtēti faktiskie pētījumi.

Testēšanas pārskats

53. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela:

- fizikālās īpašības, tīrība un fizikālķīmiskās īpašības,
- identifikācijas dati.

Nesējiela (attiecīgā gadījumā):

- nesējvielas izvēles pamatojums, ja nesējiela nav ūdens.

Testa dzīvnieki:

- izmantotās sugas/līnijas,
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,
- izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs utt.,
- katra dzīvnieka svars testa sākumā,
- sugas izvēles pamatojums, ja tā nav žurka.

Testēšanas apstākļi:

- devu līmeņa izvēles pamatojums,
- sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas maisījuma/uztura preparātu, sasniegto koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,
- sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanu,
- attiecīgā gadījumā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas (ppm) barībā vai dzeramajā ūdenī pārrēķins faktiskajā devā (mg uz kg ķermeņa svara dienā),
- sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti.

Izmeklētie neobligātie beigupunkti:

- izmeklēto neobligāto beigupunktu saraksts.

Rezultāti:

- ķermeņa svars / ķermeņa svara maiņas,
- attiecīgā gadījumā barības patēriņš un ūdens patēriņš,
- dati par toksisko atbildes reakciju pēc dzimuma un devu līmeņa, ieskaitot toksicitātes pazīmes,
- klīniski novērotās ietekmes veids, smagums un ilgums (vai nu atgriezeniska, vai neatgriezeniska ietekme),
- sensoriskās aktivitātes, satveršanas stipruma un motoriskās aktivitātes novērtējums,
- hematoloģiskie testi ar attiecīgajām izejvērtībām,
- klīniski bioķīmiskie testi ar attiecīgajām izejvērtībām,
- ķermeņa svars eitanāzijas laikā un orgānu svars,
- autopsijas atrade,
- visu histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultātu sīks apraksts,
- dati par absorbciju, ja pieejami,
- rezultātu statistiskā apstrāde, ja iespējams.

*Komentāri par rezultātiem**Secinājumi*

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Androgenitāte ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā funkcionēt kā dabiskam androgēnu tipa hormonam (piemēram, testosteronam).

Antiandrogenitāte ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska androgēnu tipa hormona (piemēram, testosterona) darbību.

Antiestrogenitāte ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska estrogēnu tipa hormona (piemēram, estradiola 17β) darbību.

Antitireoidāla iedarbība ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā nomākt dabiska vairogdziedzera hormona (piemēram, T₃) darbību.

Dozējums ir vispārīgs termins, kas aptver devu, tās došanas biežumu un ilgumu.

Deva ir ievadītās testējamās ķīmiskās vielas daudzums. Devu izsaka ar testējamās ķīmiskās vielas svaru uz testa dzīvnieka ķermeņa svara vienību dienā (piemēram, mg uz kg ķermeņa svara dienā) vai kā nemainīgu koncentrāciju barībā.

Acīmredzama toksicitāte ir vispārīgs termins, kas apzīmē acīmredzamas toksicitātes pazīmes pēc testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas. Šīm pazīmēm jābūt pietiekamām, lai varētu novērtēt risku, un tādām, lai varētu sagaidīt, ka ievadītās devas palielināšana izraisīs smagas toksiskās iedarbības pazīmes un, iespējams, mirstību.

NOAEL ir akronīms, kas apzīmē līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme. Tas ir augstākais devas līmenis, kurā netiek konstatētas ar vielas saņemšanu saistītas negatīvas parādības.

Estrogenitāte ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam estrogēnu tipa hormonam (piemēram, estradiolam 17β).

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Tireoidāla iedarbība ir ķīmiskās vielas spēja zīdītāja organismā darboties kā dabiskam vairogdziedzera hormonam (piemēram, T₃).

Validēšana ir zinātnisks process, kas paredzēts, lai noskaidrotu prasības un ierobežojumus testēšanas metodes izmantošanā un pierādītu metodes uzticamību un noderību konkrētam nolūkam.

2. papildinājums

Ieteicamie beigupunkti, pēc kuriem B.7. testēšanas metodes ietvaros noteic endokrīnās sistēmas traucējumu izraisītājus

Obligātie beigupunkti	Neobligātie beigupunkti
Svars	
— Sēklinieki	— Olnīcas
— Sēklinieku piedēkļi	— Dzemde un dzemdes kakls
— Virsnieru dziedzeri	— Vairogdziedzeris
— Prostata un sēklas pūslīši ar koagulācijas dziedzeri	
Histopatoloģija	
— Gonādas:	— Vaginālās uztriepes
— sēklinieki	— Tēviņu krūts dziedzeri
— olnīcas	— Hipofīze
— Dzimūorgānu sistēmas palīgorgāni:	
— sēklinieku piedēkļi	
— prostata un sēklas pūslīši ar koagulācijas dziedzeri	
— dzemde un dzemdes kakls	
— Virsnieru dziedzeris	
— Vairogdziedzeris	
— Maksts	
Hormonu mērījumi	
	— T3, T4 aprites līmeņi
	— TSH aprites līmeņi

LITERATŪRA

- (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.
- (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-11th 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.

B.8. SUBAKŪTĀ INHALĀCIJAS TOKSICITĀTE: 28 DIENU PĒTĪJUMS

KOPSAVILKUMS

Šī pārskatītā B.8. testēšanas metode ir izstrādāta, lai pilnībā raksturotu testējamās ķīmiskās vielas inhalācijas toksicitāti pēc atkārtotas ekspozīcijas uz ierobežotu laiku (28 dienas) un lai nodrošinātu datus kvantitatīviem inhalācijas riska novērtējumiem. Vismaz piecu tēviņu un piecu mātīšu grauzēju grupas sešas stundas dienā 28 dienas tiek pakļautas a) testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai trīs vai vairākos koncentrācijas līmeņos; b) filtrēta gaisa (negatīva kontrole) iedarbībai; un/vai c) nesējvielas iedarbībai (nesējvielas kontrole). Dzīvniekus parasti iedarbībai pakļauj piecas dienas nedēļā, bet ir atļauta arī ekspozīcija septiņas dienas nedēļā. Testā vienmēr ietver gan tēviņus, gan mātītes, bet tos var pakļaut dažādiem koncentrācijas līmeņiem, ja ir zināms, ka viens dzimums pret attiecīgo testējamo ķīmisko vielu ir uzņēmīgāks. Šī metode pētījuma vadītājam nodrošina iespēju, lai labāk raksturotu testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu, paredzēt satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas), bronhoalveolāro lavāžu (BAL), neiroloģiskos testus un papildu klīniski patoloģiskos un histopatoloģiskos izvērtējumus.

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 412 (2009. gads). Subakūtajai inhalācijas toksicitātei veltīto Testēšanas norādījumu 412 (TG 412) sākotnējā versija tika pieņemta 1981. gadā (1). Šī B.8. testēšanas metode (kas ir līdzvērtīga pārskatītajiem TG 412) ir atjaunināta, lai atspoguļotu zinātniskos atklājumus un lai nodrošinātu atbilstību pašreizējām un turpmākajām regulatīvajām vajadzībām.
2. Šī metode ļauj raksturot nelabvēlīgo ietekmi pēc katru dienu atkārtotas inhalatīvās ekspozīcijas testējamajai ķīmiskajai vielai 28 dienu laikā. Datus, ko iegūst 28 dienu subakūtās inhalācijas toksicitātes pētījumos, var izmantot kvantitatīviem riska novērtējumiem (ja tiem neseko 90 dienu subhroniskās inhalācijas toksicitātes pētījums (šā pielikuma B.29. nodaļa)). Dati var arī sniegt informāciju par koncentrāciju izvēli ilgāka termiņa pētījumiem, piemēram, 90 dienu subhroniskās inhalācijas toksicitātes pētījumam. Šī testēšanas metode nav īpaši paredzēta nanomateriālu testēšanai. Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas šīs nodaļas beigās un Norādījumu dokumentā Nr. 39 (2).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

3. Lai uzlabotu pētījuma kvalitāti un līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu, testēšanas laboratorijai ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu. Informācija, kas palīdzēs izvēlēties attiecīgas testa koncentrācijas, var ietvert testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes testu rezultātus; paredzētos lietošanas veidus un iespējamo cilvēka ekspozīciju; pieejamos (Q)SAR datus un toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām vielām; kā arī datus, kas iegūti no akūtās inhalācijas toksicitātes testiem. Ja tiek paredzēta vai pētījuma gaitā novērota neitrotoksicitāte, pētījuma vadītājs var izmantot attiecīgus izvērtējumus, piemēram, funkcionālo novērojumu sēriju (FOB) un motoriskās aktivitātes mērījumus. Lai gan ekspozīciju laika pieskaņošanai konkrētiem izmeklējumiem var būt izšķiroša nozīme, šo papilddarbību īstenošana nedrīkst traucēt pamatpētījuma plānam.
4. Kairinošu vai kodīgu testējamo ķīmisko vielu atšķaidījumus var testēt koncentrācijās, kas nodrošinās vajadzīgo toksicitātes pakāpi (sk. *GD 39 (2)*). Pakļaujot dzīvniekus šo materiālu iedarbībai, mērķkoncentrācijām jābūt pietiekami zemām, lai neradītu izteiktas sāpes un ciešanas, tomēr tām jābūt pietiekamām, lai koncentrācijas un atbildes reakcijas līknes pagarinātu līdz līmeņiem, kas sasniedz testa regulatīvo un zinātnisko mērķi. Šīs koncentrācijas ir jāizvēlas katrā gadījumā atsevišķi, vēlam, pamatojoties uz attiecīgi izplānotu diapazona noteikšanas pētījumu, kas sniedz informāciju par kritisko beigupunktu, kairinājuma sliekšni un ietekmes sākumu (sk. 11.–13. punktu). Izraudzītās koncentrācijas jāpamato.
5. Mirstoši dzīvnieki, kā arī dzīvnieki, kas acīm redzami cieš sāpes vai pārdzīvo stipras un ilgstošas ciešanas, ir humāni jānonāvē. Mirstošos dzīvniekus ņem vērā tāpat kā testa laikā mirušos dzīvniekus. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu nonāvēt mirstošus dzīvniekus un dzīvniekus, kam ir smagas ciešanas, kā arī norādījumi par paredzamu vai neizbēgamu nobeigšanos ir sniegti *ESAO Guidance Document on Humane Endpoints (3)*.

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

6. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši grauzēji, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Ieteicamā suga ir žurka. Ja tiek izmantotas citas sugas, tas jāpamato.

Dzīvnieku sagatavošana

7. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Dienā, kad veic nejaušinātu izvēli, dzīvniekiem jābūt jauniem pieaugušiem dzīvniekiem 7–9 nedēļu vecumā. Ķermeņa svaram jābūt $\pm 20\%$ no katra dzimuma vidējā ķermeņa svara. Dzīvniekus izvēlas nejaušināti, marķējot individuāli identifikēšanai un līdz testa sākumam vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

Dzīvnieku turēšana

8. Lai atvieglotu novērojumu veikšanu un izvairītos no pārpratumiem, dzīvnieki ir individuāli jāidentificē, ja iespējams, ar zemādas retranslatoriem. Temperatūrai eksperimenta dzīvnieku turēšanas telpā jābūt $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Relatīvo mitrumu vēlam uzturēt 30–70 % diapazonā, lai gan tas var būt neiespējami, ja par nesējvielu izmanto ūdeni. Pirms un pēc ekspozīcijām dzīvnieki parasti ir jātur būros grupās pēc dzimuma un koncentrācijas, bet dzīvnieku skaits būrī nedrīkst traucēt katra dzīvnieka novērošanu, kā arī dzīvnieku skaitam ir jābūt tādām, lai iespējami mazāki būtu zudumi kanibālisma un kaušanās dēļ. Ja tiek izmantota vienīgi dzīvnieku deguna ekspozīcija, var būt vajadzīgs dzīvniekus aklimatizēt fiksācijas caurulēm. Fiksācijas caurules nedrīkst dzīvniekiem radīt nevajadzīgu fizisku, termisku vai ar imobilizāciju saistītu stresu. Fiksācija var ietekmēt fizioloģiskos beigupunktus, piemēram, ķermeņa temperatūru (hipertermija) un/vai plaušu minūtes tilpumu. Ja ir pieejami vispārīgi dati, kas apliecina, ka nekādas šādas pārmaiņas nerodas vērā ņemamā apmērā, iepriekšēja pielāgošanās fiksācijas caurulēm nav vajadzīga. Ja tiek izmantota visa ķermeņa ekspozīcija aerosolam, dzīvnieki ekspozīcijas laikā ir jātur atsevišķi, lai tie nevarētu uzņemt testējamo aerosolu no citu būra dzīvnieku apmatojuma. Izņemot ekspozīcijas laiku, var izmantot tradicionālu un sertificētu laboratorijas uzturu, ko papildina ar neierobežotu daudzumu krāna dzeramā ūdens. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā.

Inhalācijas kameras

9. Izvēloties inhalācijas kameru, jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas veids un testa priekšmets. Visieteicamākā metode ir dzīvnieka deguna ekspozīcija (šis termins aptver dzīvnieka galvas, deguna vai snuķa ekspozīciju). Dzīvnieka deguna ekspozīcija ir parasti ieteicama šķidro vai cieto aerosolu pētījumiem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Pētījuma konkrētos mērķus, iespējams, var labāk sasniegt, izmantojot visa ķermeņa ekspozīciju, bet tas ir jāpamato pētījuma ziņojumā. Lai nodrošinātu atmosfēras stabilitāti, izmantojot visa ķermeņa kameru, testa dzīvnieku kopējais apjoms nedrīkst pārsniegt 5 % no kameras tilpuma. Deguna un visa ķermeņa ekspozīcijas paņēmieni principi un to konkrētās priekšrocības un trūkumi ir aprakstīti *GD 39 (2)*.

TOKSICITĀTES PĒTĪJUMI

Robežkoncentrācijas

10. Pretēji akūtās toksicitātes pētījumiem 28 dienu subakūtās inhalācijas toksicitātes pētījumiem nav noteiktu robežkoncentrāciju. Nosakot maksimālās testa koncentrācijas, jāņem vērā: 1) maksimālā sasniedzamā koncentrācija; 2) cilvēka ekspozīcijas līmeņa "sliktākais scenārijs"; 3) nepieciešamība saglabāt pietiekamu skābekļa padevi; un/vai 4) dzīvnieku labturības apsvērumi. Ja nav pieejami ar datiem pamatoti ierobežojumi, var izmantot Regulā (EK) Nr. 1272/2008 (13) noteiktās akūtās toksicitātes robežkoncentrācijas (t. i., līdz maksimālajai koncentrācijai 5 mg/l aerosoliem, 20 mg/l tvaikiem un 20 000 ppm gāzēm) (sk. GD 39 (2)). Ja, testējot gāzes vai ļoti gaistošas testējamās ķīmiskās vielas (piemēram, aukstumaģentus), ir nepieciešams pārsniegt šīs robežvērtības, tas jāpamato. Robežkoncentrācijai ir jāizraisa nepārprotama toksicitāte, neradot nevajadzīgu stresu dzīvniekiem un neskarot to mūža ilgumu (3).

Diapazona noteikšanas pētījums

11. Pirms galvenā pētījuma sākšanas var būt nepieciešams veikt diapazona noteikšanas pētījumu. Diapazona noteikšanas pētījums ir vispusīgāks par devu diapazona pētījumu, jo tas neattiecas tikai uz koncentrāciju izvēli. Diapazona noteikšanas pētījumā iegūtās zināšanas var palīdzēt sekmīgi īstenot galveno pētījumu. Piemēram, diapazona noteikšanas pētījuma rezultātā var iegūt tehnisku informāciju par analītiskajām metodēm, daļiņu lieluma noteikšanu un toksisku mehānismu atklāšanu, klīniskās patoloģijas un histopatoloģijas datus, kā arī aplēses par to, kādas varētu būt galvenā pētījuma NOAEL un MTC koncentrācijas. Pētījuma vadītājs var izvēlēties izmantot diapazona noteikšanas pētījumu, lai noteiktu elpošanas sistēmas kairinājuma sliekšni (piemēram, ar elpošanas sistēmas histopatoloģiju, plaušu funkcijas testēšanu vai bronhoalveolāru lavāžu), augstāko koncentrāciju, kas ir panesama, neradot dzīvniekiem nevajadzīgu stresu, un parametrus, kuri vislabāk raksturo testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu.
12. Diapazona noteikšanas pētījumā var aplūkot vienu vai vairākus koncentrācijas līmeņus. Katra koncentrācijas līmeņa iedarbībai nevajadzētu pakļaut vairāk kā trīs tēviņus un trīs mātītes. Diapazona noteikšanas pētījumam jāilgst vismaz piecas dienas un parasti ne vairāk kā 14 dienas. Pētījuma ziņojumā tas jāpamato galvenā pētījuma koncentrāciju izvēlei. Galvenā pētījuma mērķis ir parādīt koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarību, pamatojoties uz prognozēto jutīgāko beigupunktu. Par zemāko koncentrāciju ieteicams izvēlēties toksiskiem preparātiem, nav novērojama nelabvēlīga ietekme, savukārt augstākajai koncentrācijai ir jāizraisa nepārprotama toksicitāte, neradot dzīvniekiem nevajadzīgu stresu un neietekmējot to mūža ilgumu (3).
13. Izvēloties koncentrācijas līmeņus diapazona noteikšanas pētījumam, jāņem vērā visa pieejamā informācija, tostarp struktūras un aktivitātes sakarības un dati par līdzīgām ķīmiskajām vielām (sk. 3. punktu). Diapazona noteikšanas pētījumā var verificēt/atspēkot viedokļus par jutīgākajiem mehāniskajiem beigupunktiem, tādēļ kā holīnesterāzes inhibīcija ar organofosfātiem, methemoglobīna veidošanās ar eritrocītiem toksiskiem preparātiem, vairogdziedzerim toksisku vielu ietekme uz vairogdziedzera hormoniem (T_3 , T_4), bronhoalveolārā lavāžā konstatētas olbaltumvielas, LDH vai neitrofili attiecībā uz inertām mazšķīstošām daļiņām vai plaušas kairinošiem aerosoliem.

Galvenais pētījums

14. Subakūtās toksicitātes galvenais pētījums parasti aptver trīs koncentrācijas līmeņus, kā arī pēc vajadzības līdztekus veiktu negatīvu (gaisa) un/vai nesējvielas kontroli (sk. 17. punktu). Izvēloties attiecīgus ekspozīcijas līmeņus, ir jāizmanto visi pieejamie dati, tostarp sistēmiskās toksicitātes pētījumu, metabolisma un kinētikas rezultāti (īpaši jācenšas izvairīties no augstiem koncentrācijas līmeņiem, kas piesātina kinētiskos procesus). Katrā testa grupā ir vismaz 10 grauzēji (pieci tēviņi un piecas mātītes), ko pakļauj testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai sešas stundas dienā piecas dienas nedēļā četras nedēļas pēc kārtas (kopējais pētījuma ilgums ir 28 dienas). Dzīvniekus var iedarbībai pakļaut arī septiņas dienas nedēļā (piemēram, testējot ieelpojamus farmaceitiskos preparātus). Ja ir zināms, ka kāds no dzimumiem pret attiecīgo testējamo ķīmisko vielu ir uzņēmīgāks, dzimumus var pakļaut dažādu koncentrācijas līmeņu iedarbībai, lai optimizētu koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarību, kā aprakstīts 15. punktā. Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti grauzēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var koriģēt tā, lai iespējami mazinātu attiecīgajai sugai raksturīgās ciešanas. Ja ekspozīcijas ilgums dienā ir mazāks par sešām stundām vai ja ir jāveic liela ilguma (piemēram, 22 stundas dienā) visa ķermeņa ekspozīcijas pētījums, tas jāpamato (sk. GD 39 (2)). Ekspozīcijas laikā dzīvniekus nevajadzētu barot, ja vien ekspozīcija neilgst vairāk par sešām stundām. Visa ķermeņa ekspozīcijas laikā var pastāvīgi nodrošināt ar ūdeni.
15. Ar izraudzītajām mērķkoncentrācijām ir jānoskaidro mērķorgāns(-i) un jāparāda skaidra koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarība:
- augstākajam koncentrācijas līmenim ir jāizraisa toksiska ietekme, bet tas nedrīkst radīt ilgstošas pazīmes vai mirstību, kuras dēļ nebūtu iespējama lietderīga izvērtēšana,
 - vidējiem koncentrācijas līmeņiem ir jābūt pakāpeniskiem, lai starp zemākās un augstākās koncentrācijas iedarbību būtu novērojama pakāpeniska toksiska ietekme,
 - zemākajā koncentrācijas līmenī toksicitātei ir jāizpaužas maz vai vispār nav jāizpaužas.

Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) pētījums

16. Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) pētījumu var izmantot, lai novērotu toksicitātes atgriezeniskumu, noturību vai aizkavētu parādīšanos attiecīgā laikā (bet ne mazāk kā 14 dienas) pēc vielas ievadīšanas. Satelītgrupās (atgriezeniskuma grupās) ir pieci tēviņi un piecas mātītes, ko eksponē vienlaikus ar galvenā pētījuma eksperimentālajiem dzīvniekiem. Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) ir jāpakļauj testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai augstākajā koncentrācijas līmenī, kā arī pēc vajadzības līdztekus jāizmanto gaisa un/vai nesējvielas kontrolgrupas (sk. 17. punktu).

Kontroldzīvnieki

17. Ar līdztekus veiktajā negatīvajā (gaisa) kontrolē izmantotajiem dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat kā ar testa grupas dzīvniekiem, izņemot to, ka tos pakļauj filtrēta gaisa, nevis testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai. Ja testa atmosfēras ģenerēšanai izmanto ūdeni vai citu vielu, pētījumā negatīvas (gaisa) kontroles grupas vietā ir jāizmanto nesējvielas kontroles grupa. Kad vien iespējams, par nesējvielu ir jāizmanto ūdens. Ja par nesējvielu izmanto ūdeni, kontroldzīvniekus pakļauj tāda gaisa iedarbībai, kura relatīvais mitrums atbilst ekspozīcijas gaisa mitrumam. Piemērota nesējviela jāizvēlas, balstoties uz pienācīgi veiktu priekšizpēti vai vēsturiskiem datiem. Ja nesējvielas toksiskums nav droši zināms, pētījuma vadītājs dažkārt izmanto gan negatīvas (gaisa) kontroles grupu, gan nesējvielas kontroles grupu, bet tas nekādā ziņā nav ieteicams. Ja vēsturiskie dati norāda, ka nesējviela nav toksiska, negatīvas (gaisa) kontroles grupa nav nepieciešama un ir jāizmanto vienīgi nesējvielas kontroles grupa. Ja kādā nesējvielā iestrādātās testējamās ķīmiskās vielas priekšizpētē toksicitāti neatklāj, secina, ka šī nesējviela testētajā koncentrācijā nav toksiska, un kontrolgrupai jāizmanto tieši šī nesējviela.

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻI**Koncentrāciju ievadīšana**

18. Dzīvnieki tiek pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai gāzes, tvaiku, aerosola vai to sajaukuma veidā. Testējamais agregātvoklis ir atkarīgs no testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, izraudzītās koncentrācijas un/vai fizikālās formas, kas testējamās ķīmiskās vielas apstrādes un izmantošanas laikā ir visvarbūtīgākā. Higroskopiskas un ķīmiski reaģējošas testējamās ķīmiskās vielas ir jātestē sausa gaisa apstākļos. Jāraugās, lai nerastos sprādzienbīstamas koncentrācijas. Lai samazinātu daļiņu lielumu, to materiālu var pakļaut mehāniskiem procesiem. Papildu norādījumi ir sniegti GD 39 (2).

Daļiņu sadalījums pēc lieluma

19. Daļiņu sadalījums pēc lieluma jānoteic visiem aerosoliem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Lai nodrošinātu visu elpošanas sistēmas attiecīgo rajonu ekspozīciju, ir ieteicami aerosoli ar masas vidējo aerodinamisko diametru (MMAD) diapazonā no 1 līdz 3 μm ar ģeometrisko standartnovirzi (σ_g) diapazonā no 1,5 līdz 3,0 (4). Iespēju robežās ir jācenšas nodrošināt atbilstību šim standartam, bet, ja tas nav iespējams, ir jāsniedz eksperta atzinums. Piemēram, metālu izgarojumu daļiņas var būt mazākas par šo standartu, savukārt lādētas daļiņas un šķiedrmateriāli šo standartu var pārsniegt.

Testējamās ķīmiskās vielas sagatavošana nesējvielā

20. Testu ar testējamo ķīmisko vielu ir vēlams veikt bez nesējvielas. Ja ir nepieciešams izmantot nesējvielu, lai iegūtu testējamās ķīmiskās vielas attiecīgu koncentrāciju un daļiņu lielumu, priekšroka dodama ūdenim. Ja testējamo ķīmisko vielu izšķīdina nesējvielā, ir jāpierāda tās stabilitāte.

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻU MONITORINGS**Gaisa plūsma caur kameru**

21. Katras ekspozīcijas laikā ir rūpīgi jākontrolē, nepārtraukti jāmonitorē un vismaz reizi stundā jāreģistrē gaisa plūsma caur ekspozīcijas kameru. Testa atmosfēras koncentrācijas (vai laiciskās stabilitātes) reāllaika monitorings ir visu dinamisko parametru integrāla mērīšana, kas dod iespēju netieši kontrolēt visus attiecīgos dinamiskos inhalācijas parametrus. Ja koncentrācija tiek uzraudzīta reāllaikā, gaisa plūsmu mērījumu biežumu var samazināt līdz vienam mērījumam katrā ekspozīcijas dienā. Īpaši jāraugās, lai deguna ekspozīcijas kamerās nenotiktu izelpotā gaisa ieelpošana. Skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 19 %, un oglekļa dioksīda koncentrācija nedrīkst pārsniegt 1 %. Ja ir pamats uzskatīt, ka nav iespējams nodrošināt atbilstību šim standartam, skābekļa un oglekļa dioksīda koncentrācijas ir jāizmēra. Ja pirmās dienas mērījumi parāda, ka šo gāzu līmeņi ir atbilstīgi, turpmāki mērījumi nav vajadzīgi.

Temperatūra un relatīvais mitrums kamerā

22. Temperatūra kamerā jāuztur $22 \pm 3^\circ\text{C}$ robežās. Gan deguna, gan visa ķermeņa ekspozīciju gadījumā katras ekspozīcijas laikā, ja iespējams, ir nepārtraukti jāmonitorē un reizi stundā jāreģistrē relatīvais mitrums dzīvnieku inhalācijas zonā. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt 30–70 % diapazonā, bet tas var nebūt izdarāms (piemēram, kad tiek testēti maisījumi uz ūdens bāzes) vai izmērāms, jo testējamā ķīmiskā viela interferē ar testēšanas metodi.

Testējamā ķīmiskā viela: nominālā koncentrācija

23. Kad vien iespējams, ir jāaprēķina un jāreģistrē nominālā koncentrācija ekspozīcijas kamerā. Nominālā koncentrācija ir generētās testējamās ķīmiskās vielas masa, ko daļa ar inhalācijas kameras sistēmai cauri izlaista gaisa kopējo tilpumu. Nominālo koncentrāciju neizmanto, lai raksturotu dzīvnieku ekspozīciju, taču nominālās koncentrācijas un faktiskās koncentrācijas salīdzinājums sniedz norādes par testa sistēmas ģenerēšanas efektivitāti, tādējādi to var izmantot, lai atklātu ģenerēšanas problēmas.

Testējamā ķīmiskā viela: faktiskā koncentrācija

24. Faktiskā koncentrācija ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kas noteikta dzīvnieku inhalācijas zonā inhalācijas kamerā. Faktiskās koncentrācijas var uzzināt vai nu ar specifiskām metodēm (piemēram, tiešo paraugu ņemšanu, adsorbcijas vai ķīmiskās reaģēšanas metodēm un turpmāku analītisko raksturošanu), vai ar tādām nespecifiskām metodēm kā gravimetriskā filtra analīze. Gravimetriskās analīzes izmantošana ir pieņemama tikai attiecībā uz vienas sastāvdaļas pulvera aerosoliem vai aerosoliem ar zemas gaistamības šķidrumiem, turklāt šī analīze ir jābalsta uz attiecīgiem testējamās ķīmiskās vielas raksturojumiem pirms pētījuma veikšanas. Koncentrācijas noteikšanu ar gravimetrisko analīzi var veikt arī vairāku sastāvdaļu pulvera aerosoliem. Tomēr tam ir vajadzīgi analītiskie dati, kas pierāda, ka gaisā pārnestajam materiālam sastāvs ir tāds pats kā sākotnējam materiālam. Ja šāda informācija nav pieejama, pētījuma laikā var būt nepieciešams ar regulāriem intervāliem atkārtoti analizēt testējamo ķīmisko vielu (vēlams, kad tā tiek pārnēsāta gaisā). Attiecībā uz aerosola preparātiem, kas var iztvaikot vai sublimēties, ir jāpierāda, ka visas fāzes tika ievāktas ar izraudzīto metodi.
25. Ja iespējams, visa pētījuma laikā jāizmanto vienas sērijas testējamā ķīmiskā viela, un testējamais paraugs ir jāglabā apstākļos, kas uztur tā tīrību, homogenitāti un stabilitāti. Pirms pētījuma sākšanas ir jau jābūt aprakstam par testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, arī par tās tīrību un, ja tehniski iespējams, identitāti, un konstatēto piesārņotāju un piemaisījumu daudzumu. To var pierādīt ar šādiem datiem (bet ne tikai): aiztures laiks un relatīvā maksimuma zona, molekulmasa no maspektrometrijas vai gāzhromatogrāfijas analīzes, vai citām aplēsēm. Lai gan testēšanas laboratorija nav atbildīga par testējamā parauga identitāti, tai būtu ieteicams vismaz zināmā mērā pārliecināties par sponsora sniegto raksturojumu (piemēram, krāsa, fizikālās īpašības utt.)
26. Ekspozīcijas atmosfēra ir jāuztur iespējami nemainīga. Lai pierādītu ekspozīcijas apstākļu stabilitāti, var izmantot reāllaika monitoringa ierīci, piemēram, aerosolu fotometru aerosoliem vai kopējo ogļūdeņražu analizatoru tvaikiem. Katrā ekspozīcijas dienā katram ekspozīcijas līmenim faktiskā koncentrācija kamerā ir jāmēra vismaz trīs reizes. Ja sakarā ar ierobežotu gaisa caurplūdumu vai zemu koncentrāciju tas nav iespējams, var pietikt ar vienu paraugu vienas ekspozīcijas laikā. Vēlams šo paraugu ievākt visu ekspozīcijas laiku. Atsevišķiem kameras koncentrācijas paraugiem nevajadzētu atšķirties no kameras vidējās koncentrācijas vairāk kā par $\pm 10\%$ gāzēm un tvaikiem un $\pm 20\%$ šķidrumiem vai cietiem aerosoliem. Ir jāaprēķina un jāreģistrē laiks, kas vajadzīgs, līdz kamerā iestājas līdzsvara stāvoklis (t_{95}). Ekspozīcijas ilgums atbilst laikam, kurā tiek ģenerēta testējamā ķīmiskā viela. Tajā ieskaita laiku, kas vajadzīgs, lai kamerā sasniegtu līdzsvara stāvokli (t_{95}) un koncentrācijas samazināšanos. Norādījumi par t_{95} aplēsēm ir sniegti GD 39 (2).
27. Ļoti sarežģītiem maisījumiem, kas sastāv no gāzēm/tvaikiem, un aerosoliem (piemēram, degšanas atmosfērām un testējamām ķīmiskām vielām, kuru izplūde notiek no konkrētam galalietojumam paredzētiem izstrādājumiem/ierīcēm) katra fāze inhalācijas kamerā var izturēties atšķirīgi. Tāpēc katrai fāzei (gāze/tvaiki un aerosols) ir jāizvēlas vismaz viena indikatorviela (analīts), kas parasti ir maisījuma galvenā aktīvā viela. Ja testējamā ķīmiskā viela ir maisījums, analītiskā koncentrācija ir jānorāda kopējam maisījumam, nevis tikai aktīvajai sastāvdaļai vai indikatorvielai (analītam). Papildu informācija par faktiskajām koncentrācijām ir pieejama GD 39 (2).

Testējamā ķīmiskā viela: daļiņu sadalījums pēc lieluma

28. Aerosolu daļiņu sadalījums pēc lieluma jānosaka vismaz reizi nedēļā katram koncentrācijas līmenim, izmantojot kaskādes impaktoru vai alternatīvu instrumentu, piemēram, aerodinamisko daļiņu mērītāju (APS). Ja var pierādīt, ka ar kaskādes impaktoru vai alternatīvu instrumentu iegūtie rezultāti ir līdzvērtīgi, alternatīvo instrumentu var izmantot visā pētījumā.
29. Lai iegūtu apstiprinājumu, ka galvenais ievākšanas instruments nodrošina pietiekamu vākšanas efektivitāti, paralēli šim galvenajam instrumentam ir jāizmanto otra iekārta, piemēram, gravimetriskais filtrs vai atsītējs/gāzes barbotieris. Daļiņu lieluma analīzē iegūtajai masas koncentrācijas vērtībai jābūt saprātīgās robežās salīdzinājumā ar filtra analīzē iegūto masas koncentrācijas vērtību (sk. GD 39 (2)). Ja pētījuma agrīnā posmā visu testēto koncentrāciju gadījumā var pierādīt līdzvērtību, turpmāki apstiprinoši mērījumi nav vajadzīgi. Dzīvnieku labturības nolūkos jāveic pasākumi, kas iespējami mazinātu nepārliecināšu datu ieguvu, kuru dēļ var būt nepieciešams atkārtot pētījumu.
30. Ir jānosaka daļiņu lielums tādiem tvaikiem, kuru kondensāts varētu izveidot aerosolu vai kuru veidotā atmosfērā tiek konstatētas daļiņas, kas liek domāt par jauktu fāžu iespējamību.

NOVĒROJUMI

31. Dzīvnieki ir klīniski jānovēro pirms un pēc ekspozīcijas perioda, kā arī tā laikā. Atkarībā no dzīvnieku atbildes reakcijas ekspozīcijas laikā var noteikt biežākus novērojumus. Ja dzīvnieku novērošanu traucē dzīvnieku fiksācijas cauruļu izmantošana, vāji apgaismotas visa ķermeņa ekspozīcijas kameras vai neizgaismota atmosfēra, dzīvnieki ir uzmanīgi jānovēro pēc ekspozīcijas. Novērojumos pirms nākamās dienas ekspozīcijas var novērtēt toksiskās ietekmes atgriezeniskumu vai saasināšanos.
32. Visus novērojumus reģistrē, par katru dzīvnieku glabājot atsevišķus pierakstus. Ja dzīvnieki ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ vai atrasti miruši, iespējami precīzi ir jāreģistrē nāves iestāšanās laiks.
33. Novērojot dzīvniekus būros, ir jāpievērš uzmanība ādas un apmatojuma, acu un gļotādu, kā arī elpošanas, asinsrites, nervu sistēmas, somatomotorikas un uzvedības reakciju pārmaiņām. Jāpievērš uzmanība novērojumiem attiecībā uz drebuļiem, krampjiem, siekalošanos, caureju, letargiju, miegu un komu. Rektāli temperatūras mērījumi var nodrošināt papildu liecības par reflektorisku bradipnoju vai hipotermiju/hipertermiju, kas saistīta ar vielas saņemšanu vai kustību ierobežošanu. Pētījuma protokolā var ietvert papildu novērtējumus, piemēram, par kinētiku, biomonitoringu, plaušu funkciju, aizturētiem mazšķīstošiem materiāliem, kas uzkrājas plaušu audos, un uzvedības maiņām.

ĶERMEŅA SVARS

34. Katra dzīvnieka svars ir jāreģistrē drīz pēc pirmās ekspozīcijas (0. diena), pēc tam divreiz nedēļā (piemēram, piektdienās un pirmdienās, lai parādītu atveseļošanās nedēļas nogalē, kurā nenotiek ekspozīcija, vai ar laika intervāliem, kas ļauj novērtēt sistēmisko toksicitāti) un nāves iestāšanās vai eitanāzijas brīdī. Ja pirmo divu nedēļu laikā netiek novērota nekāda ietekme, pārējā pētījuma laikā ķermeņa svaru var noteikt reizi nedēļā. Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) dzīvniekus (ja tos izmanto) ir jāturpina svērt reizi nedēļā visā atveseļošanās periodā. Beidzot pētījumu, visi dzīvnieki ir jānosver neilgi pirms nonāvēšanas, lai nodrošinātu orgānu un ķermeņa svara attiecību objektīvu aprēķinu.

BARĪBAS UN ŪDENS PATĒRIŅŠ

35. Barības patēriņš ir jānosaka reizi nedēļā. Var noteikt arī ūdens patēriņu.

KLĪNISKĀ PATOLOĢIJA

36. Klīniskās patoloģijas novērtēšana ir jāveic visiem dzīvniekiem, arī kontroles un satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) dzīvniekiem, kad šos dzīvniekus nonāvē. Ir jāreģistrē laika intervāls starp ekspozīcijas beigām un asins parauga ņemšanu, it sevišķi, ja attiecīgais beigupunkts strauji atjaunojas. Parametriem ar īsu pussabrukšanas periodu plazmā (piemēram, *COHb*, *CHE* un *MetHb*) ir ieteicama paraugu ņemšana pēc ekspozīcijas pabeigšanas.
37. Turpmāk 1. tabulā ir uzskaitīti klīniskās patoloģijas parametri, kas parasti ir vajadzīgi visiem toksikoloģijas pētījumiem. Urīnanalīze parasti nav jāveic, bet to var veikt, ja to uzskata par lietderīgu, jo tiek prognozēta vai novērota toksicitāte. Lai labāk raksturotu testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti, pētījuma vadītājs var izvēlēties novērtēt papildu parametrus (piemēram, holīnesterāzi, lipīdus, hormonus, skābju/bāzu līdzsvaru, methemoglobīnu vai Heinca ķermenīšus, kreatīnkināzi, mieloīdu/eritroīdu attiecību, troponīnus, arteriālo asiņu gāzes, laktātdihidrogenāzi, sorbitoldehidrogenāzi, glutamātdihidrogenāzi un gamma glutamiltranspeptidāzi).

1. tabula

Klīniskās patoloģijas standartparametri

Hematoloģija	
Eritrocītu skaits	Kopējais leukocītu skaits
Hematokrīts	Diferenciālais leukocītu skaits
Hemoglobīna koncentrācija	Trombocītu skaits
Vidējais korpuskulārais hemoglobīns	Asins recētspēja (izvēlieties vienu):
Vidējais korpuskulārais tilpums	— protrombīna laiks
Vidējā korpuskulārā hemoglobīna koncentrācija	— recēšanas laiks
Retikulocīti	— daļējais tromboplastīna laiks

Klīniskā ķīmija	
Glikoze (*)	Alanīna aminotransferāze
Kopējais holesterīns	Aspartāta aminotransferāze
Triglicerīdi	Alkalīnfosfatāze
Asins urīnvielas slāpekļis	Kālijs
Kopējais bilirubīns	Nātrijs
Kreatinīns	Kalcijs
Kopējais olbaltums	Fosfors
Albumīns	Hlorīds
Globulīns	
Urīnanalīze (pēc izvēles)	
Izskats (krāsa un duļķainība)	Kopējais olbaltums
Tilpums	Glikoze
Īpatnējais svars vai osmolalitāte	Asinis / asins šūnas
pH	
(*) Tā kā ilgstošs nebarošanas periods var apdraudēt testa dzīvnieku glikozes mērījumu objektivitāti salīdzinājumā ar kontrol-dzīvnieku glikozes mērījumiem, pētījuma vadītājam ir jānosaka, vai dzīvnieku nebarošana ir piemērota pieeja. Ja tiek izmantots nebarošanas periods, tam ir jābūt piemērotam izmantotajām sugām. Žurkai tas varētu būt 16 stundas (nebarošana uz nakti). Glikozi tukšā dūšā var noteikt pēc nakts nebarošanas perioda pēdējā ekspozīcijas nedēļā vai pēc nakts nebarošanas perioda pirms autopsijas (ja to nosaka pirms autopsijas, tas jādara kopā ar visiem pārējiem klīniskās patoloģijas parametriem).	

38. Ja pastāv liecības, ka galvenā nogulsnešanās un aiztures vieta ir elpošanas sistēmas lejasdaļa (t. i., alveolas), bronhoalveolāra lavāža (BAL) var būt piemērots paņēmieni, ar ko kvantitatīvi analizēt uz hipotēzi pamatotus devas un ietekmes parametrus, koncentrējot uzmanību uz alveolītu, plaušu iekaisumu un fosfolipidozi. Tas ļauj attiecīgi analizēt atbildes reakciju uz devu un alveolāro bojājumu pārmaiņas laika gaitā. BAL šķidrumu var analizēt, lai noteiktu leukocītu kopējo un diferenciālo skaitu, kopējo olbaltumu un laktātdehidrogenāzi. Vēl var aplūkot parametrus, kas liecina par lizosomu bojājumiem, fosfolipidozi, fibrozi un kairinošu vai alerģisku iekaisumu, sakarā ar kuru var noteikt arī iekaisuma reakciju veicinātājus citokīnus/hemokīnus. BAL mērījumi parasti papildina histopatoloģijas izmeklējumu rezultātus, bet nevar tos aizstāt. Norādījumi par plaušu lavāžas veikšanu pieejami GD 39 (2).

SMAGĀ PATOLOĢIJA UN ORGĀNU SVARS

39. Visiem testa dzīvniekiem, arī tiem, kas testa laikā nobeigušies vai kas izņemti no pētījuma dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ, ir jāveic pilna atasiņošana (ja iespējams) un pilna autopsija. Ir jāreģistrē laiks starp katra dzīvnieka pēdējās ekspozīcijas beigām un eitanāziju. Ja autopsiju nevar izdarīt tūlīt pēc mirušā dzīvnieka atklāšanas, dzīvnieks ir jāievieto ledusskapī (bez sasaldēšanas) temperatūrā, kas ir pietiekami zema, lai iespējami mazinātu autolīzi. Autopsijas jāveic iespējami drīz, parasti dienas vai divu dienu laikā. Visas smagās patoloģiskās pārmaiņas ir jāreģistrē par katru dzīvnieku, īpašu uzmanību pievēršot jebkādam elpošanas sistēmas pārmaiņām.
40. Turpmāk 2. tabulā ir uzskaitīti orgāni un audi, kas pilnās autopsijas laikā ir jāsaņemā piemērotā līdzeklī histopatoloģisko izmeklējumu veikšanai. Lēmums par [iekavās] norādīto orgānu un audu konservēšanu, kā arī jebkādu citu orgānu un audu konservēšanu ir pētījuma vadītāja ziņā. **Treknrakstā** uzskaitītie orgāni ir jāatbrīvo no audiem un jānosver uzreiz pēc sekcijas, kamēr tie ir mitri un nesažuvuši. Vairogdziedzeris un sēklinieku piedēkļi jānosver tikai tādā gadījumā, ja tas vajadzīgs, jo atbrīvošana no artefaktiem var traucēt histopatoloģisku izvērtēšanu. Audu un orgānu fiksācija jāveic 10 % bufervielas formalinā vai citā piemērotā fiksācijas šķīdumā tūlīt pēc autopsijas un ne mazāk kā 24–48 stundas pirms atbrīvošanas no audiem atkarībā no izmantotā fiksācijas šķīduma.

2. tabula

Orgāni un audi, ko konservē pilnas autopsijas laikā

Virsnieru dziedzeri	Sēklas pūslīši
Kaulu smadzenes (un/vai svaigs aspirāts)	Muguras smadzenes (kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona smadzenes)
Smadzenes (tostarp galveno smadzeņu, smadzenīšu un iegareno smadzeņu / smadzeņu tilta izgriezumi)	Liesa
[Acis (tīklene, acs nervs) un plakstiņi]	Kuņģis
Sirds	Sēklinieki
Nieres	Tīms
Balsene (trīs līmeņi, no tiem vienā līmenī uzgāmura pamatne)	Vairogdziedzeris
Aknas	Traheja (vismaz divi līmeņi, ieskaitot vienu garengriezumu caur elpvada ķīli elpvada dakšas vietā un vienu šķēsgriezumu)
Plauša (visas daivas vienā līmenī, ar galvenajiem bronhiem)	[Urīnpūslis]
Plaušas vārtu limfmezgli, it sevišķi tādu testējamo ķīmisko vielu gadījumā, kas sastāv no mazšķīstošām daļiņām. Padziļinātiem izmeklējumiem un/vai pētījumiem, kuros uzmanība pievērsta imunoloģiskajiem aspektiem, var apsvērt, vai ņemt papildu limfmezglus, piemēram, limfmezglus no mediastinālā, kakla/zemžokļu un/vai aurikulārā apvidus.	Dzemde
Aizdegunes audi (vismaz četri līmeņi; viens līmenis, kurā ietilpst aizdegunes kanāls un ar degunu saistītie limfātiskās sistēmas audi (NALT)).	Visi makroskopiskie bojājumi
Barības vads	
[Ožas sīpols]	
Olnīcas	

41. Lai saglabātu plaušu struktūru, tās jāizņem neskartas, jānosver un jāapstrādā ar piemērotu fiksācijas šķīdumu spiedienā, ko rada 20–30 cm dziļš ūdens (5). Visu daivu, arī galveno bronhu, izgriezumi jāievāc vienā līmenī, bet, ja veic plaušu lavāžu, neskatotā daiva ir jāizgriež trijos līmeņos (tās nedrīkst būt sēriju sekcijas).
42. Aizdegunes audi ir jāizmeklē vismaz četros līmeņos, no kuriem vienam ir jāaptver aizdegunes kanāls (5, 6, 7, 8, 9), lai varētu pienācīgi izmeklēt plakano epitēliju, pārejas epitēliju (elpceļu bezskropstīnepitēliju), elpceļu epitēliju (elpceļu skropstīnepitēliju) un ožas epitēliju, un limfātiskie drenējošie audi (NALT; 10, 11). Balsene ir jāizmeklē trijos līmeņos, no kuriem vienam ir jāaptver uzgāmura pamatne (12). Ir jāizmeklē vismaz divi trahejas līmeņi, ieskaitot vienu garengriezumu caur elpvada ķīli elpvada dakšas vietā un vienu šķēsgriezumu.

HISTOPATOĻĢIJA

43. Visu 2. tabulā uzskaitīto orgānu un audu histopatoloģiskā izvērtēšana jāizdara kontrolgrupai, augstākās koncentrācijas grupai, kā arī visiem dzīvniekiem, kas nobeidzas vai tiek nonāvēti pētījuma laikā. Īpaša uzmanība ir jāpievērš elpošanas sistēmai, mērķorgāniem un makroskopiskiem bojājumiem. Tie orgāni un audi, kuriem augstākās koncentrācijas grupā ir novēroti bojājumi, ir jāizmeklē visām grupām. Lai parādītu nepārprotamu atbildes reakciju uz koncentrāciju, pētījuma vadītājs var izvēlēties veikt histopatoloģisku izvērtēšanu papildu grupām. Ja izmanto satelītgrupu (atgriezeniskuma grupu), histopatoloģiskā izvērtēšana ir jāizdara visiem audiem un orgāniem, uz kuriem vielu saņēmušajās grupās ir konstatēta ietekme. Ja augstākās koncentrācijas grupā ir novēroti pārmērīgi daudz agrīnas nobeigšanās gadījumu vai citas problēmas, kas mazina datu būtiskumu, ir histopatoloģiski jāizmeklē nākamā zemāka koncentrācijas līmeņa grupa. Jāmēģina rast korelāciju starp pilnas autopsijas datiem un mikroskopijas rezultātiem.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

44. Ir jāsniedz dati par katra dzīvnieka ķermeņa svaru, barības patēriņu, klīnisko patoloģiju, smagu patoloģiju, orgānu svaru un histopatoloģiju. Klīnisko novērojumu dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot to dzīvnieku skaitu, kuri izmantoti, to dzīvnieku skaitu, kuriem parādījušās noteiktas toksicitātes pazīmes, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā atrasti nobeigušies vai ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ, atsevišķu dzīvnieku nāves iestāšanās laiku, toksiskās ietekmes raksturu, norisi laikā un atgriezeniskumu, kā arī autopsijas atradi. Gan kvantitatīvie, gan papildu rezultāti ir jānovērtē ar attiecīgu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru vispārpieņemtu statistikas metodi. Statistikas metodes ir jāizvēlas pētījuma plānošanas laikā.

Testēšanas pārskats

45. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testa dzīvnieki un dzīvnieku turēšana:

- apraksts par apstākļiem būros, arī dzīvnieku skaits (vai skaita maiņa) katrā būrī, pakaiši, temperatūra un relatīvais mitrums, apgaismojuma ilgums un informācija par uzturu,
- izmantotās sugas/līnija un pamatojums, kādēļ ir izmantota cita suga, kas nav žurka. Var norādīt avotu un vēsturiskos datus, ja tie ir par dzīvniekiem, kas pakļauti tādai pašai ekspozīcijai, turēšanas apstākļiem un nebarošanas režīmiem,
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,
- nejaušināšanas metode,
- jebkāda pirmtesta sagatavošana, ieskaitot uzturu, karantīnu un slimības ārstēšanu.

Testējamā ķīmiskā viela:

- fizikālā daba, tīrība un attiecīgos gadījumos arī fizikālķīmiskās īpašības (ieskaitot izomerizāciju),
- identifikācijas dati un reģistrācijas numurs Ķīmijas referatīvajā žurnālā (CAS), ja zināms.

Nesējviela:

- nesējvielas izmantošanas pamatojums un nesējvielas izvēles pamatojums (ja tā nav ūdens),
- vēsturiski vai vienlaicīgi dati, kas pierāda, ka nesējviela neietekmē pētījuma rezultātu.

Inhalācijas kamera:

- inhalācijas kameras sīks apraksts, ieskaitot tilpumu un shēmu,
- dzīvnieku ekspozīcijai un atmosfēras ģenerēšanai izmantotā aprīkojuma izcelsme un apraksts,
- temperatūras, mitruma, daļiņu lieluma un faktiskās koncentrācijas mērīšanas aprīkojums,
- kondicionēšanai izmantotais gaisa avots un sistēma,
- metodes, ko izmanto homogēnas testa atmosfēras nodrošināšanas aprīkojuma kalibrēšanai,
- spiediena starpība (pozitīva vai negatīva),
- ekspozīcijas portu skaits kamerā (deguna ekspozīcija); dzīvnieku atrašanās vieta kamerā (visa ķermeņa ekspozīcija),

- testa atmosfēras stabilitāte,
- temperatūras un mitruma sensoru atrašanās vieta un testa atmosfēras paraugu ņemšana kamerā,
- pievadītā un aizvadītā gaisa apstrāde,
- gaisa caurplūduma rādītāji: gaisa caurplūdums uz vienu ekspozīcijas portu (deguna ekspozīcija) vai dzīvniek-slodze/kamera (visa ķermeņa ekspozīcija),
- laiks, kas vajadzīgs, lai inhalācijas kamerā sasniegtu līdzsvaru (t_{95}),
- tilpuma nomaiņu skaits stundā,
- mērīšanas ierīces (attiecīgā gadījumā).

Ekspozīcijas dati:

- pamatojums par mērķkoncentrācijas izvēli galvenajam pētījumam,
- nominālās koncentrācijas (inhalācijas kamerā ģenerētās testējamās ķīmiskās vielas kopējā masa, kas dalīta ar kamerai caurplūdušā gaisa tilpumu),
- testējamās ķīmiskās vielas faktiskās koncentrācijas, kas ievāktas no dzīvnieka inhalācijas zonas. Maisījumiem, kas veido heterogēnas fizikālās formas (gāzes, tvaiki, aerosoli), katru var analizēt atsevišķi,
- visas gaisa koncentrācijas pārskatā ir jānorāda masas vienībās (mg/l, mg/m³ utt.), nevis tilpuma vienībās (ppm, ppb utt.),
- daļiņu sadalījums pēc lieluma, masas vidējais aerodinamiskais diametrs (MMAD) un ģeometriskā standartnovirze (σ_g), arī to aprēķināšanas metodes. Ziņojumā jāietver atsevišķas daļiņu lieluma analīzes.

Testēšanas apstākļi:

- sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas preparātu, arī par visām procedūrām, kas izmantotas cietu materiālu daļiņu lieluma samazināšanai vai testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu sagatavošanai,
- apraksts (vēlams, kopā ar shēmu) par iekārtu, ar kuru ģenerē testa atmosfēru un dzīvniekus pakļauj tās iedarbībai,
- apraksts par aprīkojumu, ko izmanto, lai uzraudzītu kameras temperatūru, mitrumu un gaisa plūsmu (t. i., kalibrēšanas līknes attīstība),
- apraksts par aprīkojumu, ko izmanto, lai paņemtu paraugus nolūkā noteikt koncentrāciju kamerā un daļiņu sadalījumu pēc lieluma,
- sīka informācija par izmantoto ķīmiski analītisko metodi un metodes validēšanu (ieskaitot to, cik efektīva ir testējamās ķīmiskās vielas atgūšana no paraugu ņemšanas vides),
- metode, ar kādu ir nejaušināti izraudzīti dzīvnieki testa un kontroles grupām,
- sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti (ieskaitot uztura veidu/avotu, ūdens avotu),
- testa koncentrāciju izvēles pamatojums.

Rezultāti:

- tabula ar kameras temperatūru, mitrumu un gaisa plūsmu,
- tabula ar datiem par kameras nominālo un faktisko koncentrāciju,

- tabula ar datiem par daļiņu lielumu, ieskaitot analītisko paraugu ņemšanas datus, daļiņu sadalījumu pēc lieluma un MMAD un σ_g aprēķinus,
- tabula ar datiem par katra dzīvnieka atbildes reakciju un koncentrācijas līmeni (t. i., dzīvnieki, kam izpaukušās toksicitātes pazīmes, arī mirstība; ietekmes veids, ietekmes smagums, sākumpunkts un ilgums),
- tabula ar datiem par katra dzīvnieka svaru,
- tabula ar datiem par barības patēriņu,
- tabula ar klīniskās patoloģijas datiem,
- katra dzīvnieka autopsijas atrade un histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultāti, ja pieejami,
- tabula ar jebkādiem citiem parametriem, kas tikuši mērīti.

Rezultātu interpretācija un komentāri:

- īpaši svarīgi ir aprakstīt metodes, kas izmantotas, lai nodrošinātu, ka ir apmierināti šīs testa metodes kritēriji, piemēram, attiecībā uz robežkoncentrācijām vai daļiņu lielumu,
- ir jāapspriež daļiņu ielūpojamība, ņemot vērā kopējos konstatējumus, it sevišķi, ja nav izdevies nodrošināt atbilstību daļiņu lieluma kritērijiem,
- pētījuma kopējā novērtējumā ir jānorāda nominālās un faktiskās koncentrācijas noteikšanai izmantoto metožu saskaņotība, kā arī faktiskās koncentrācijas attiecība pret nominālo,
- jāapspriež, kāds varētu būt nāves cēlonis un galvenais iedarbības veids (sistēmisks vai vietējs),
- jāsniedz paskaidrojums, ja, pamatojoties uz ESAO *Guidance Document on Humane Endpoints* (3) kritērijiem, bija humāni jānonāvē dzīvnieki, kas cieta sāpes vai izrādīja smagu un ilgstošu ciešanu pazīmes,
- jānorāda mērķorgāns(-i),
- jānosaka NOAEL un LOAEL.

LITERATŪRA

- (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.

-
- (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) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJA

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.”;

5) pielikuma B.29. un B.30. nodaļu aizstāj ar šādām:

“B.29. SUBHRONISKĀ INHALĀCIJAS TOKSICITĀTE: 90 DIENU PĒTĪJUMS

KOPSAVILKUMS

Šī B.29. pārskatītā testēšanas metode ir izstrādāta, lai pilnībā raksturotu testējamās ķīmiskās vielas inhalācijas toksicitāti pēc subhroniska perioda (90 dienas) un lai nodrošinātu uzticamus datus kvantitatīviem inhalācijas riska novērtējumiem. Desmit tēviņu un 10 mātišu graužēju grupas sešas stundas dienā 90 dienas (13 nedēļas) tiek pakļautas a) testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai trīs vai vairākos koncentrācijas līmeņos; b) filtrēta gaisa (negatīva kontrole) iedarbībai; un/vai c) nesējvielas iedarbībai (nesējvielas kontrole). Dzīvniekus iedarbībai parasti pakļauj piecas dienas nedēļā, bet ir atļauta arī ekspozīcija septiņas dienas nedēļā. Testā vienmēr ietver gan tēviņus, gan mātiņas, bet tos var pakļaut dažādiem koncentrācijas līmeņiem, ja ir zināms, ka viens dzimums pret attiecīgo testējamo ķīmisko vielu ir uzņēmīgāks. Šī metode pētījuma vadītājam nodrošina iespēju, lai labāk raksturotu testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu, paredzēt satelītkrupas (atgriezeniskuma grupas), dzīvnieku nonāvēšanu testa laikā, bronhoalveolāru lavāžu (BAL), neiroloģiskos testus un papildu klīniski patoloģiskos un histopatoloģiskos izvērtējumus.

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 413 (2009. gads). Subhroniskai inhalācijas toksicitātei vēltoto Testēšanas norādījumu 413 (TG 413) sākotnējā versija tika pieņemta 1981. gadā (1). Šī B.29. testēšanas metode (kas ir līdzvērtīga pārskatītajiem TG 413 (2009. gads)) ir atjaunināta, lai atspoguļotu zinātniskos atklājumus un lai nodrošinātu atbilstību pašreizējām un turpmākām regulatīvajām vajadzībām.
2. Subhroniskās inhalācijas toksicitātes pētījumus galvenokārt izmanto, lai izstrādātu regulatīvas koncentrācijas un novērtētu darba ņēmēju risku darba vidē. Tos arī izmanto, lai novērtētu risku, kam cilvēki ir pakļauti mājās, transportā, kā arī vides risku. Šī metode ļauj raksturot nelabvēlīgo ietekmi pēc katru dienu atkārtotas inhalatīvas ekspozīcijas testējamajai ķīmiskajai vielai 90 dienu laikā (apmēram 10 % no žurkas mūža). Datus, ko iegūst šādos subhroniskās inhalācijas toksicitātes pētījumos, var izmantot kvantitatīvajiem riska novērtējumiem un koncentrāciju izvēlei hroniskās toksicitātes pētījumiem. Šī testēšanas metode nav īpaši paredzēta nanomateriālu testēšanai. Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas šīs nodaļas beigās un Norādījumu dokumentā Nr. 39 (GD 39) (2).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

3. Lai uzlabotu pētījuma kvalitāti un līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu, testēšanas laboratorijai pirms pētījuma veikšanas ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu. Informācija, kas palīdzēs izvēlēties piemērotas testa koncentrācijas, var ietvert testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes testu rezultātus; paredzētos lietošanas veidus un iespējamo cilvēka ekspozīciju; pieejamos (Q)SAR datus un toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām vielām; kā arī datus, kas iegūti citos atkārtotas ekspozīcijas testos. Ja tiek paredzēta vai pētījuma gaitā tiek novērota neirotoksicitāte, pētījuma vadītājs var izvēlēties ietvert attiecīgu izvērtēšanu, piemēram, funkcionālu novērojumu sēriju (FOB) un motoriskās aktivitātes mērījumus. Lai gan ekspozīciju laika pieskaņošanai konkrētiem izmeklējumiem var būt izšķiroša nozīme, šo papilddarbību īstenošana nedrīkst traucēt pamatpētījuma plānam.
4. Kairinošu vai kodīgu testējamo ķīmisko vielu atšķaidījumus var testēt koncentrācijās, kas nodrošinās vajadzīgo toksicitātes pakāpi. Papildu informāciju sk. GD 39 (2). Pakļaujot dzīvniekus šo materiālu iedarbībai, mērķkoncentrācijām jābūt pietiekami zemām, lai neradītu izteiktas sāpes un ciešanas, tomēr tām jābūt pietiekamām, lai koncentrācijas un atbildes reakcijas līknes pagarinātu līdz līmeņiem, kas sasniedz testa regulatīvo un zinātnisko mērķi. Šīs koncentrācijas ir jāizvēlas katrā gadījumā atsevišķi, vēlam, pamatojoties uz attiecīgi izplānotu diapazona noteikšanas pētījumu, kas sniedz informāciju par kritisko beigupunktu, kairinājuma sliekšni un ietekmes sākumu (sk. 11.–13. punktu). Izraudzītās koncentrācijas jāpamato.
5. Mirstoši dzīvnieki, kā arī dzīvnieki, kas acīm redzami cieš sāpes vai pārdzīvo stipras un ilgstošas ciešanas, ir humāni jānonāvē. Mirstošos dzīvniekus ņem vērā tāpat kā testa laikā mirušos dzīvniekus. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu nonāvēt mirstošos dzīvniekus un dzīvniekus, kam ir smagas ciešanas, kā arī norādījumi par paredzamu vai neizbēgamu nobeigšanos ir sniegti ESAO *Guidance Document on Humane Endpoints* (3).

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

6. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši grauzēji, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Ieteicamā suga ir žurka. Ja tiek izmantotas citas sugas, tas jāpamato.

Dzīvnieku sagatavošana

7. Mātītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Dienā, kad veic nejaušīnātu izvēli, dzīvniekiem jābūt jauniem pieaugušiem dzīvniekiem (7–9 nedēļu vecumā). Ķermeņa svaram jābūt $\pm 20\%$ no katra dzimuma vidējā ķermeņa svara. Dzīvniekus ņem nejaušināti, marķē individuālai identificēšanai un līdz testa sākumam vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos.

Dzīvnieku turēšana

8. Dzīvniekus ir vēlams individuāli identificēt, ieteicams, ar zemādas retranslatoriem, lai atvieglotu novērojumu veikšanu un izvairītos no pārpratumiem. Temperatūrai eksperimenta dzīvnieku turēšanas telpā jābūt $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt 30–70 % diapazonā, lai gan tas var būt neiespējami, ja par nesējvielu izmanto ūdeni. Pirms un pēc ekspozīcijām dzīvnieki parasti ir jātur būros grupās pēc dzimuma un koncentrācijas, bet dzīvnieku skaits būrī nedrīkst traucēt katra dzīvnieka novērošanu, kā arī dzīvnieku skaitam ir jābūt tādām, lai iespējami mazāki būtu zudumi kanibālisma un kaušanās dēļ. Ja tiek izmantota vienīgi dzīvnieku deguna ekspozīcija, var būt vajadzīgs dzīvniekus aklimatizēt fiksācijas caurulēm. Fiksācijas caurules nedrīkst dzīvniekiem radīt nevajadzīgu fizisku, termisku vai ar imobilizāciju saistītu stresu. Fiksācija var ietekmēt fizioloģiskos beigupunktus, piemēram, ķermeņa temperatūru (hipertermija) un/vai plaušu minūtes tilpumu. Ja ir pieejami vispārīgi dati, kas apliecina, ka nekādas šādas pārmaiņas nerodas vērā ņemamā apmērā, iepriekšēja pielāgošanās fiksācijas caurulēm nav vajadzīga. Ja tiek izmantota visa ķermeņa ekspozīcija aerosolam, dzīvnieki ekspozīcijas laikā ir jātur atsevišķi, lai tie nevarētu uzņemt testējamo aerosolu no citu būra dzīvnieku apmatojuma. Izņemot ekspozīcijas laiku, var izmantot tradicionālu un sertificētu laboratorijas uzturu, ko papildina ar neierobežotu daudzumu krāna dzeramā ūdens. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā.

Inhalācijas kameras

9. Izvēloties inhalācijas kameru, jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas veids un testa priekšmets. Visieteicamākā metode ir dzīvnieka deguna ekspozīcija (šis termins aptver dzīvnieka galvas, deguna vai snuķa ekspozīciju). Dzīvnieka deguna ekspozīcija ir parasti ieteicama šķidro vai cieto aerosolu pētījumiem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Pētījuma konkrētos mērķus, iespējams, var labāk sasniegt, izmantojot visa ķermeņa ekspozīciju, bet tas ir jāpamato pētījuma ziņojumā. Lai nodrošinātu atmosfēras stabilitāti, izmantojot visa ķermeņa kameru, testa dzīvnieku kopējais apjoms nedrīkst pārsniegt 5 % no kameras tilpuma. Deguna un visa ķermeņa ekspozīcijas paņēmieni principi un to konkrētās priekšrocības un trūkumi ir aprakstīti GD 39 (2).

TOKSICITĀTES PĒTĪJUMI

Robežkoncentrācijas

10. Pretēji akūtās toksicitātes pētījumiem subhroniskās inhalācijas toksicitātes pētījumiem nav noteiktu robežkoncentrāciju. Nosakot maksimālās testa koncentrācijas, jāņem vērā: 1) maksimālā sasniedzamā koncentrācija; 2) cilvēka ekspozīcijas līmeņa "slīkākais scenārijs"; 3) nepieciešamība saglabāt pietiekamu skābekļa padevi; un/vai 4) dzīvnieku labturības apsvērumi. Ja nav pieejami ar datiem pamatoti ierobežojumi, var izmantot Regulā (EK) Nr. 1272/2008 (13) noteiktās akūtās toksicitātes robežkoncentrācijas (t. i., līdz maksimālajai koncentrācijai 5 mg/l aerosoliem, 20 mg/l tvaikiem un 20 000 ppm gāzēm) (sk. GD 39 (2)). Ja, testējot gāzes vai ļoti gaistošas testējamās ķīmiskās vielas (piemēram, aukstumaģentus), ir nepieciešams pārsniegt šīs robežkoncentrācijas, tas jāpamato. Robežkoncentrācijai ir jāizraisa nepārprotama toksicitāte, neradot nevajadzīgu stresu dzīvniekiem un neskarot to mūža ilgumu (3).

Diapazona noteikšanas pētījums

11. Pirms galvenā pētījuma sākšanas parasti ir nepieciešams veikt diapazona noteikšanas pētījumu. Diapazona noteikšanas pētījums ir vispusīgāks par devu diapazona pētījumu, jo tas neattiecas tikai uz koncentrāciju izvēli. Diapazona noteikšanas pētījumā iegūtās zināšanas var palīdzēt sekmīgi īstenot galveno pētījumu. Piemēram, diapazona noteikšanas pētījuma rezultātā var iegūt tehnisku informāciju par analītiskajām metodēm, daļiņu lieluma noteikšanu un toksisku mehānismu atklāšanu, klīniskās patoloģijas un histopatoloģijas datus, kā arī aplēses par to, kādas varētu būt galvenā pētījuma NOAEL un MTC koncentrācijas. Pētījuma vadītājs var izvēlēties izmantot diapazona noteikšanas pētījumu, lai noteiktu elpošanas sistēmas kairinājuma sliekšni (piemēram, ar elpošanas sistēmas histopatoloģiju, plaušu funkcijas testēšanu vai bronhoalveolāru lavāžu), augstāko koncentrāciju, kas ir panesama, neradot dzīvniekiem nevajadzīgu stresu, un parametrus, kuri vislabāk raksturo testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu.

12. Diapazona noteikšanas pētījumā var aplūkot vienu vai vairākus koncentrācijas līmeņus. Atkarībā no izraudzītajiem beigupunktiem katra koncentrācijas līmeņa iedarbībai jāpakļauj 3–6 tēviņi un 3–6 mātītes. Diapazona noteikšanas pētījumam jāilgst vismaz piecas dienas un parasti ne vairāk kā 28 dienas. Pētījuma ziņojumā tas jāpamato galvenā pētījuma koncentrāciju izvēlei. Galvenā pētījuma mērķis ir parādīt koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarību, pamatojoties uz prognozēto jutīgāko beigupunktu. Par zemāko koncentrāciju ieteicams izvēlēties koncentrāciju, kuras gadījumā nav novērojama nelabvēlīga ietekme, savukārt augstākajai koncentrācijai ir jāizraisa nepārprotama toksicitāte, neradot nevajadzīgu stresu dzīvniekiem un neskarot to mūža ilgumu (3).
13. Izvēloties koncentrācijas līmeņus diapazona noteikšanas pētījumam, jāņem vērā visa pieejamā informācija, tostarp struktūras un aktivitātes sakarības un dati par līdzīgām ķīmiskajām vielām (sk. 3. punktu). Diapazona noteikšanas pētījumā var verificēt/atspēkot viedokļus par jutīgākajiem mehāniskajiem beigupunktiem, tādēļ kā holīnesterāzes inhibēšana ar organofosfātiem, methemoglobīna veidošana ar eritrocītiem toksiskiem preparātiem, vairogdziedzerim toksisku vielu ietekme uz vairogdziedzera hormoniem (T_3 , T_4), bronhoalveolārā lavāžā konstatētas olbaltumvielas, LDH vai neitrofili attiecībā uz inertām mazšķīstošām daļiņām vai plaušas kairinošiem aerosoliem.

Galvenais pētījums

14. Subhroniskās toksicitātes galvenais pētījums parasti aptver trīs koncentrācijas līmeņus, kā arī pēc vajadzības vienlaicīgas negatīvas (gaisa) un/vai nesējvielas kontroles (sk. 18. punktu). Izvēloties attiecīgus ekspozīcijas līmeņus, ir jāizmanto visi pieejamie dati, tostarp sistēmiskās toksicitātes pētījumu, metabolisma un kinētikas rezultāti (īpaši jācenšas izvairīties no augstiem koncentrācijas līmeņiem, kas piesātina kinētiskos procesus). Katrā testa grupā ir 10 grauzēju tēviņi un 10 grauzēju mātītes, ko pakļauj testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai sešas stundas dienā piecas dienas nedēļā 13 nedēļas pēc kārtas (kopējais pētījuma ilgums ir vismaz 90 dienas). Dzīvniekus var iedarbībai pakļaut arī septiņas dienas nedēļā (piemēram, testējot ieelpojamus farmaceitiskos preparātus). Ja ir zināms, ka kāds no dzimumiem pret attiecīgo testējamo ķīmisko vielu ir uzņēmīgāks, dzimumus var pakļaut dažādu koncentrācijas līmeņu iedarbībai, lai optimizētu koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarību, kā aprakstīts 15. punktā. Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti grauzēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var korigēt tā, lai iespējami mazinātu attiecīgajai sugai raksturīgās ciešanas. Ja ekspozīcijas ilgums dienā ir mazāks par sešām stundām vai ja ir jāveic liela ilguma (piemēram, 22 stundas dienā) visa ķermeņa ekspozīcijas pētījums, tas jāpamato (sk. GD 39) (2). Ekspozīcijas periodā dzīvniekus nevajadzētu barot, ja vien ekspozīcija neilgst vairāk par sešām stundām. Visa ķermeņa ekspozīcijas laikā var pastāvīgi nodrošināt ar ūdeni.
15. Ar izraudzītajām mērķkoncentrācijām ir jānoskaidro mērķorgāns(-i) un jāparāda skaidra koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarība:
- augstākajam koncentrācijas līmenim ir jāizraisa toksiska ietekme, bet tas nedrīkst radīt ilgstošas pazīmes vai mirstību, kuras dēļ nebūtu iespējama lietderīga izvērtēšana,
 - vidējiem koncentrācijas līmeņiem ir jābūt pakāpeniskiem, lai nodrošinātu pakāpenisku toksisko ietekmi starp zemākās un augstākās koncentrācijas iedarbību,
 - zemākajā koncentrācijas līmenī toksicitātei ir jāizpaužas maz vai vispār nav jāizpaužas.

Dzīvnieku nonāvēšana testa laikā

16. Ja ir plānota dzīvnieku nonāvēšana testa laikā, dzīvnieku skaits katram ekspozīcijas līmenim ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kurus līdz pētījuma beigām plānots nonāvēt. Dzīvnieku nonāvēšana testa laikā jāpamato, un šie dzīvnieki pienācīgi jāatspoguļo statistikas analizēs.

Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) pētījums

17. Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) pētījumu var izmantot, lai novērotu toksicitātes atgriezeniskumu, noturību vai aizkavētu parādīšanos attiecīgā laikā (bet ne mazāk kā 14 dienas) pēc vielas ievadīšanas. Satelītgrupās (atgriezeniskuma grupās) ir 10 tēviņi un 10 mātītes, ko vienlaikus ar galvenā pētījuma eksperimentālajiem dzīvniekiem pakļauj ekspozīcijai. Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) ir jāpakļauj testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai augstākajā koncentrācijas līmenī, kā arī pēc vajadzības līdztekus jāveic gaisa un/vai nesējvielas kontrole (sk. 18. punktu).

Kontrol dzīvnieki

18. Ar līdztekus veiktajā negatīvajā (gaisa) kontrolē izmantotajiem dzīvniekiem rīkojas tieši tāpat kā ar testa grupas dzīvniekiem, izņemot to, ka tos pakļauj filtrēta gaisa, nevis testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai. Ja testa atmosfēras ģenerēšanā izmanto ūdeni vai citu vielu, pētījumā negatīvas (gaisa) kontroles grupas vietā ir jāizmanto nesējvielas kontroles grupa. Kad vien iespējams, par nesējvielu ir jāizmanto ūdens. Ja par nesējvielu izmanto ūdeni, kontrol dzīvniekus pakļauj tāda gaisa iedarbībai, kura relatīvais mitrums atbilst ekspozīcijas gaisa

mitrumam. Piemērota nesējviela jāizvēlas, balstoties uz pienācīgi veiktu priekšizpēti vai vēsturiskiem datiem. Ja nesējvielas toksiskums nav droši zināms, pētījuma vadītājs dažkārt izvēlas izmantot gan negatīvas (gaisa) kontroles grupu, gan nesējvielas kontroles grupu, bet tas nekādā ziņā nav ieteicams. Ja vēsturiskie dati norāda, ka nesējviela nav toksiska, negatīvas (gaisa) kontroles grupa nav nepieciešama un ir jāizmanto vienīgi nesējvielas kontroles grupa. Ja kādā nesējvielā iestrādātas testējamās ķīmiskās vielas priekšizpētē toksicitāti neatklāj, secina, ka šī nesējviela testētajā koncentrācijā nav toksiska, un kontrolgrupai jāizmanto tieši šī nesējviela.

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻI

Koncentrāciju ievadīšana

19. Dzīvnieki tiek pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai gāzes, tvaiku, aerosola vai to sajaukuma veidā. Testējamais agregātstāvoklis ir atkarīgs no testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, izraudzītajām koncentrācijām un/vai fizikālās formas, kas testējamās ķīmiskās vielas apstrādes un izmantošanas laikā ir visvarbūtīgākā. Higroskopiskas un ķīmiski reaģējošas testējamās ķīmiskās vielas ir jātestē sausa gaisa apstākļos. Jāraugās, lai nerastos sprādzienbīstamas koncentrācijas. Lai samazinātu daļiņu lielumu, to materiālus var pakļaut mehāniskiem procesiem. Papildu norādījumi ir sniegti *GD 39 (2)*.

Daļiņu sadalījums pēc lieluma

20. Daļiņu lieluma noteikšana jāveic visiem aerosoliem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Lai nodrošinātu visu elpošanas sistēmas attiecīgo rajonu ekspozīciju, ir ieteicami aerosoli ar masas vidējo aerodinamisko diametru (MMAD) diapazonā no 1 līdz 3 μm ar ģeometrisko standartnovirzi (σ_g) diapazonā no 1,5 līdz 3 (4). Iespēju robežās ir jācenšas nodrošināt atbilstību šim standartam, bet, ja tas nav iespējams, ir jāsniedz eksperta atzinums. Piemēram, metālu izgarojumu daļiņas būs mazākas par šo standartu, savukārt lādētas daļiņas un šķiedrmateriāli šo standartu var pārsniegt.

Testējamās ķīmiskās vielas sagatavošana nesējvielā

21. Testu ar testējamo ķīmisko vielu ir vēlams veikt bez nesējvielas. Ja ir nepieciešams izmantot nesējvielu, lai iegūtu testējamās ķīmiskās vielas attiecīgu koncentrāciju un daļiņu lielumu, priekšroka dodama ūdenim. Ja testējamo ķīmisko vielu izšķīdina nesējvielā, ir jāpierāda tās stabilitāte.

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻU UZRAUDZĪBA

Gaisa plūsma caur kameru

22. Katras ekspozīcijas laikā ir rūpīgi jākontrolē, nepārtraukti jāmonitorē un vismaz reizi stundā jāreģistrē gaisa plūsma caur ekspozīcijas kameru. Testa atmosfēras koncentrācijas (vai laiciskās stabilitātes) reāllaika monitorings ir visu dinamisko parametru integrāla mērīšana, kas dod iespēju netieši kontrolēt visus attiecīgos dinamiskos inhalācijas parametrus. Ja koncentrācija tiek uzraudzīta reāllaikā, gaisa plūsmu mērījumu biežumu var samazināt līdz vienam mērījumam katrā ekspozīcijas dienā. Īpaši jāraugās, lai deguna ekspozīcijas kamerās nenotiktu izelpotā gaisa ieelpošana. Skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 19 %, un oglekļa dioksīda koncentrācija nedrīkst pārsniegt 1 %. Ja ir pamats uzskatīt, ka nav iespējams nodrošināt atbilstību šim standartam, skābekļa un oglekļa dioksīda koncentrācijas ir jāizmēra. Ja pirmās dienas mērījumi parāda, ka šo gāzu līmeņi ir attiecīgi, turpmāki mērījumi nav vajadzīgi.

Temperatūra un relatīvais mitrums kamerā

23. Temperatūra kamerā jāuztur $22 \pm 3^\circ\text{C}$ robežās. Relatīvais mitrums dzīvnieku inhalācijas zonā gan deguna, gan visa ķermeņa ekspozīciju gadījumā ir nepārtraukti jāmonitorē un jāreģistrē reizi stundā katras ekspozīcijas laikā, kad tas ir iespējams. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt 30–70 % diapazonā, bet tas var nebūt izdarāms (piemēram, kad tiek testēti maistījumi uz ūdens bāzes) vai izmērāms, jo testējamā ķīmiskā viela interferē ar testēšanas metodi.

Testējamā ķīmiskā viela: nominālā koncentrācija

24. Kad vien iespējams, ir jāapreķina un jāreģistrē nominālā koncentrācija ekspozīcijas kamerā. Nominālā koncentrācija ir generētās testējamās ķīmiskās vielas masa, ko daļa ar inhalācijas kameras sistēmai cauri izlaistā gaisa kopējo tilpumu. Nominālo koncentrāciju neizmanto, lai raksturotu dzīvnieku ekspozīciju, taču nominālās koncentrācijas un faktiskās koncentrācijas salīdzinājums sniedz norādes par testa sistēmas ģenerēšanas efektivitāti, tādējādi to var izmantot, lai atklātu ģenerēšanas problēmas.

Testējamā ķīmiskā viela: faktiskā koncentrācija

25. Faktiskā koncentrācija ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, kas noteikta dzīvnieku inhalācijas zonā inhalācijas kamerā. Faktiskās koncentrācijas var uzzināt vai nu ar specifiskām metodēm (piemēram, tiešo paraugu ņemšanu, adsorbācijas vai ķīmiskās reaģēšanas metodēm un turpmāku analītisko raksturošanu), vai ar tādām nespecifiskām metodēm kā gravimetriskā filtra analīze. Gravimetriskās analīzes izmantošana ir pieņemama tikai attiecībā uz vienas sastāvdaļas pulvera aerosoliem vai aerosoliem ar zemas gaistamības šķidrumiem, turklāt šī analīze ir jābalsta uz attiecīgiem testējamās ķīmiskās vielas raksturojumiem pirms pētījuma veikšanas. Koncentrācijas noteikšanu ar gravimetrisko analīzi var veikt arī vairāku sastāvdaļu pulvera aerosoliem. Tomēr tam ir vajadzīgi analītiskie dati, kas pierāda, ka gaisā pārnēstajam materiālam sastāvs ir tāds pats kā sākotnējam materiālam. Ja šāda informācija nav pieejama, pētījuma laikā var būt nepieciešams ar regulāriem intervāliem atkārtoti analizēt testējamo ķīmisko vielu (vēlams, kad tā tiek pārnēsāta gaisā). Attiecībā uz aerosola preparātiem, kas var iztvaikot vai sublimēties, ir jāpierāda, ka ar izraudzīto metodi tikušas ievāktas visas fāzes.
26. Ja iespējams, visa pētījuma laikā jāizmanto vienas sērijas testējamā ķīmiskā viela, un testējamais paraugs ir jāglabā apstākļos, kas uztur tā tīrību, homogenitāti un stabilitāti. Pirms pētījuma sākšanas ir jau jābūt aprakstam par testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, arī par tās tīrību un, ja tehniski iespējams, identitāti un konstatēto piesārņotāju un piemaisījumu daudzumu. To var pierādīt ar šādiem datiem (bet ne tikai): aiztures laiks un relatīvā maksimuma zona, molekulmasa no masspektrometrijas vai gāzhromatogrāfijas analīzes, vai citām aplēsēm. Lai gan testēšanas laboratorija nav atbildīga par testējamā parauga identitāti, tai būtu ieteicams vismaz zināmā mērā pārliecināties par sponsora sniegto raksturojumu (piemēram, krāsa, fizikālās īpašības utt.)
27. Ekspozīcijas atmosfēra ir jāuztur iespējami nemainīga. Lai pierādītu ekspozīcijas apstākļu stabilitāti, var izmantot reāllaika monitoringa ierīci, piemēram, aerosolu fotometru aerosoliem vai kopējo ogļūdeņražu analizatoru tvaikiem. Faktiskā koncentrācija kamerā ir jāmēra vismaz trīs reizes katrā ekspozīcijas dienā katram ekspozīcijas līmenim. Ja sakarā ar ierobežotu gaisa caurplūdumu vai zemu koncentrāciju tas nav iespējams, var pietikt ar vienu paraugu katras ekspozīcijas laikā. Vēlams šo paraugu ievākt visu ekspozīcijas laiku. Atsevišķiem kameras koncentrācijas paraugiem nevajadzētu atšķirties no kameras vidējās koncentrācijas vairāk kā par $\pm 10\%$ gāzēm un tvaikiem un $\pm 20\%$ šķidriem vai cietiem aerosoliem. Ir jāaprēķina un jāreģistrē laiks, kas vajadzīgs, līdz kamerā iestājas līdzsvara stāvoklis (t_{95}). Ekspozīcijas ilgums atbilst visam laikam, kad testējamā ķīmiskā viela tiek ģenerēta. Tajā ieskaita laiku, kas vajadzīgs, lai kamerā sasniegtu līdzsvara stāvokli (t_{95}) un koncentrācijas samazināšanos. Norādījumi par t_{95} aplēsēm ir sniegti GD 39 (2).
28. Ļoti sarežģītiem maisījumiem, kas sastāv no gāzēm/tvaikiem, un aerosoliem (piemēram, degšanas atmosfērām un testējamām ķīmiskām vielām, kuru izplūde notiek no konkrētam galalietojumam paredzētiem izstrādājumiem/ierīcēm) katra fāze inhalācijas kamerā var izturēties atšķirīgi. Tāpēc katrai fāzei (gāze/tvaiki un aerosols) ir jāizvēlas vismaz viena indikatorviela (analīts), kas parasti ir galvenā aktīvā sastāvdaļa maisījumā. Ja testējamā ķīmiskā viela ir maisījums, analītiskā koncentrācija ir jānorāda kopējam maisījumam, nevis tikai aktīvajai sastāvdaļai vai indikatorvielai (analītam). Papildu informācija par faktiskajām koncentrācijām ir pieejama GD 39 (2).

Testējamā ķīmiskā viela: daļiņu sadalījums pēc lieluma

29. Aerosolu daļiņu sadalījums pēc lieluma jānosaka vismaz reizi nedēļā katram koncentrācijas līmenim, izmantojot kaskādes impaktoru vai alternatīvu instrumentu, piemēram, aerodinamisko daļiņu mērītāju (APS). Ja var pierādīt, ka ar kaskādes impaktoru vai alternatīvo instrumentu iegūtie rezultāti ir līdzvērtīgi, alternatīvo instrumentu var izmantot visā pētījumā.
30. Lai iegūtu apstiprinājumu, ka galvenais ievākšanas instruments nodrošina pietiekamu vākšanas efektivitāti, paralēli šim galvenajam instrumentam ir jāizmanto otra iekārta, piemēram, gravimetriskais filtrs vai atsītējs / gāzes barbotieris. Daļiņu lieluma analīzē iegūtajai masas koncentrācijas vērtībai jābūt saprātīgās robežās salīdzinājumā ar filtra analīzē iegūto masas koncentrācijas vērtību (sk. GD 39 (2)). Ja pētījuma agrīnā posmā visu testēto koncentrāciju gadījumā var pierādīt līdzvērtību, turpmāki apstiprinoši mērījumi nav vajadzīgi. Dzīvnieku labturības nolūkos jāveic pasākumi, kas iespējami mazinātu nepārliecinošu datu iegūvi, kuru dēļ var būt nepieciešams atkārtot pētījumu.
31. Ir jānosaka daļiņu lielums tādiem tvaikiem, kuru kondensāts varētu izveidot aerosolu vai kuru veidotā atmosfērā tiek konstatētas daļiņas, kas liek domāt par jauktu fāžu iespējamību.

NOVĒROJUMI

32. Dzīvnieki ir klīniski jānovēro pirms un pēc ekspozīcijas perioda, kā arī tā laikā. Atkarībā no dzīvnieku atbildes reakcijas ekspozīcijas laikā var noteikt biežākus novērojumus. Ja dzīvnieku novērošanu traucē dzīvnieku fiksācijas cauruļu izmantošana, vāji apgaismotas visa ķermeņa ekspozīcijas kameras vai neizgaismota atmosfēra, dzīvnieki ir uzmanīgi jānovēro pēc ekspozīcijas. Novērojumos pirms nākamās dienas ekspozīcijas var novērtēt toksiskās ietekmes atgriezeniskumu vai saasināšanos.
33. Visus novērojumus reģistrē, par katru dzīvnieku glabājot atsevišķus pierakstus. Ja dzīvnieki ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ vai atrasti miruši, iespējami precīzi ir jāreģistrē nāves iestāšanās laiks.
34. Novērojot dzīvniekus būros, ir jāpievērš uzmanība ādas un apmatojuma, acu un gļotādas, kā arī elpošanas, asinsrites un nervu sistēmas, somatomotorikas un uzvedības reakciju pārmaiņām. Jāpievērš uzmanība novērojumiem attiecībā uz drebuļiem, krampjiem, siekalošanos, caureju, letarģiju, miegu un komu. Rektāli temperatūras mērījumi var nodrošināt papildu liecības par reflektorisku bradipnoju vai hipotermiju/hipertermiju, kas saistīta ar vielas saņemšanu vai kustību ierobežošanu. Pētījuma protokolā var ietvert papildu novērtējumus, piemēram, par kinētiku, biomonitoringu, plaušu funkciju, aizturētiem mazšķīstošiem materiāliem, kas uzkrājas plaušu audos, un uzvedības maiņām.

ĶERMEŅA SVARS

35. Katra dzīvnieka svars ir jāreģistrē drīz pēc pirmās ekspozīcijas (0. diena), pēc tam divreiz nedēļā (piemēram, piektdienās un pirmdienās, lai parādītu atveseļošanās nedēļas nogalē, kurā nenotiek ekspozīcija, vai ar laika intervāliem, kas ļauj novērtēt sistēmisko toksicitāti) un nāves iestāšanās vai eitanāzijas brīdī. Ja pirmo 4 nedēļu laikā netiek novērota nekāda ietekme, pārējā pētījuma laikā ķermeņa svaru var noteikt reizi nedēļā. Satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) dzīvniekus (ja tos izmanto) ir jāturpina svērt reizi nedēļā visā atveseļošanās periodā. Beidzot pētījumu, visi dzīvnieki neilgi pirms nonāvēšanas ir jānosver, lai nodrošinātu orgānu un ķermeņa svara attiecību objektīvu aprēķinu.

BARĪBAS UN ŪDENS PATĒRIŅŠ

36. Barības patēriņš ir jānosaka reizi nedēļā. Var noteikt arī ūdens patēriņu.

KLĪNISKĀ PATOLOĢIJA

37. Klīniskās patoloģijas novērtējumi ir jāveic visiem dzīvniekiem, arī kontroles un satelītgrupas (atgriezeniskuma grupas) dzīvniekiem, kad šos dzīvniekus nonāvē. Jāreģistrē laika intervāls starp ekspozīcijas beigām un asins parauga ņemšanu, it sevišķi, ja attiecīgais beigupunkts strauji atjaunojas. Parametriem ar īsu pussabrukšanas periodu plazmā (piemēram, *COHb*, *CHE* un *MetHb*) ir ieteicama paraugu ņemšana pēc ekspozīcijas pabeigšanas.
38. Turpmāk 1. tabulā ir uzskaitīti klīniskās patoloģijas parametri, kas parasti ir vajadzīgi visiem toksikoloģijas pētījumiem. Urīnanalīze parasti nav jāveic, bet to var veikt, ja to uzskata par lietderīgu, jo tiek prognozēta vai novērota toksicitāte. Lai labāk raksturotu testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti, pētījuma vadītājs var izvēlēties novērtēt papildu parametrus (piemēram, holīnesterāzi, lipīdus, hormonus, skābju/bāzu līdzsvaru, methemoglobīnu vai Heinca ķermenīšus, kreatīnkināzi, mieloīdu/eritroīdu attiecību, troponīnus, arteriālo asiņu gāzes, laktātdehidrogenāzi, sorbitāldehidrogenāzi, glutamātdehidrogenāzi un gamma glutamiltranspeptidāzi).

1. tabula

Klīniskās patoloģijas standartparametri

Hematoloģija	
Eritrocītu skaits	Kopējais leukocītu skaits
Hematokrīts	Diferenciālais leukocītu skaits
Hemoglobīna koncentrācija	Trombocītu skaits
Vidējais korpuskulārais hemoglobīns	Asins recētspēja (izvēlieties vienu):
Vidējais korpuskulārais tilpums	— protrombīna laiks
Vidējā korpuskulārā hemoglobīna koncentrācija	— recēšanas laiks
Retikulocīti	— daļējais tromboplastīna laiks

Klīniskā ķīmija	
Glikoze (*)	Alanīna aminotransferāze
Kopējais holesterīns	Aspartāta aminotransferāze
Triglicerīdi	Alkalīnfosfatāze
Asins urīnvielas slāpeklis	Kālijs
Kopējais bilirubīns	Nātrijs
Kreatinīns	Kalcijs
Kopējais olbaltums	Fosfors
Albumīns	Hlorīds
Globulīns	
Urīnanalīze (pēc izvēles)	
Izskats (krāsa un duļķainība)	Kopējais olbaltums
Tilpums	Glikoze
Īpatnējais svars vai osmolalitāte	Asinis / asins šūnas
pH	
(*) Tā kā ilgstošs nebarošanas periods var apdraudēt testa dzīvnieku glikozes mērījumu objektivitāti salīdzinājumā ar kontrol-dzīvnieku glikozes mērījumiem, pētījuma vadītājam ir jānosaka, vai dzīvnieku nebarošana ir piemērota pieeja. Ja tiek izmantots nebarošanas periods, tam ir jābūt piemērotam izmantotajam sugām. Žurkai tas varētu būt 16 stundas (nebarošana uz nakti). Glikozi tukšā dūšā var noteikt pēc nakts nebarošanas perioda pēdējā ekspozīcijas nedēļā vai pēc nakts nebarošanas perioda pirms autopsijas (ja to nosaka pirms autopsijas, tas jā dara kopā ar visiem pārējiem klīniskās patoloģijas parametriem).	

39. Ja pastāv liecības, ka galvenā nogulsnešanās un aiztures vieta ir elpošanas sistēmas lejasdaļa (t. i., alveolas), bronhoalveolāra lavāža (BAL) var būt piemērots paņēmieni, ar ko kvantitatīvi analizēt uz hipotēzi pamatotus devas un ietekmes parametrus, koncentrējot uzmanību uz alveolītu, plaušu iekaisumu un fosfolipidozi. Tas ļauj attiecīgi analizēt atbildes reakciju uz devu un alveolāro bojājumu pārmaiņas laika gaitā. BAL šķidrumu var analizēt, lai noteiktu leikocītu kopējo un diferenciālo skaitu, kopējo olbaltumu un laktātdehidrogenāzi. Vēl var aplūkot parametrus, kas liecina par lizosomu bojājumiem, fosfolipidozi, fibrozi un kairinošu vai alerģisku iekaisumu, sakarā ar kuru var noteikt arī iekaisuma reakciju veicinātājus citokīnus/hemokīnus. BAL mērījumi parasti papildina histopatoloģijas izmeklējumu rezultātus, bet nevar tos aizstāt. Norādījumi par plaušu lavāžas veikšanu pieejami GD 39 (2).

OFTALMOLOĢISKĀ IZMEKLĒŠANA

40. Ar oftalmoskopu vai līdzvērtīgu ierīci visiem dzīvniekiem pirms testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas, kā arī visām augstu koncentrāciju grupām un kontrolgrupām, pētījumu pabeidzot, ir jāveic acs dibena, acs optiskā aparāta, varavīksnienes un konjunktīvas oftalmoloģiskā izmeklēšana. Ja tiek konstatētas pārmaiņas acīs, jāizmeklē visi dzīvnieki pārējās grupās, tostarp satelītgrupā (atgriezeniskuma grupā).

SMAGA PATOLOĢIJA UN ORGĀNU SVARS

41. Visiem testa dzīvniekiem, arī tiem, kas testa laikā nobeigušies vai kas dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ izņemti no pētījuma, ir jāveic pilna atasiņošana (ja iespējams) un pilna autopsija. Ir jāreģistrē laiks starp katra dzīvnieka pēdējās ekspozīcijas beigām un eitanāziju. Ja autopsiju nevar izdarīt tūlīt pēc mirušā dzīvnieka atklāšanas, dzīvnieks ir jāievieto ledusskapī (bez sasaldēšanas) temperatūrā, kas ir pietiekami zema, lai iespējami mazinātu autolīzi. Autopsija jāveic iespējami drīz, parasti dienas vai divu dienu laikā. Visas smagās patoloģiskās pārmaiņas ir jāreģistrē par katru dzīvnieku, īpašu uzmanību pievēršot jebkādam elpošanas sistēmas pārmaiņām.
42. Turpmāk 2. tabulā ir uzskaitīti orgāni un audi, kas pilnās autopsijas laikā ir jāuzglabā piemērotā līdzeklī histopatoloģisko izmeklējumu veikšanai. Lēmums par [iekavās] norādīto orgānu un audu uzglabāšanu, kā arī jebkādu citu orgānu un audu uzglabāšanu ir pētījuma vadītāja ziņā. **Treknrakstā** uzskaitītie orgāni ir jāatbrīvo no audiem un jānosver uzreiz pēc sekcijas, kamēr tie ir mitri un nesažuvuši. Vairogdziedzeris un sēklinieku piedēklis jānosver tikai tādā gadījumā, ja tas vajadzīgs, jo atbrīvošana no artefaktiem var traucēt histopatoloģisko izvērtēšanu. Audu un orgānu fiksācija ir jāveic 10 % bufervielas formalinā vai citā piemērotā fiksācijas šķīdumā tūlīt pēc autopsijas un ne mazāk kā 24–48 stundas pirms atbrīvošanas no audiem atkarībā no izmantotā fiksācijas šķīduma.

2. tabula

Orgāni un audi, ko saglabā pilnas autopsijas laikā

Virsnieru dziedzeri	Barības vads
Aorta	[Ožas sīpols]
Kaulu smadzenes (un/vai svaigs aspirāts)	Olņīcas
Smadzenes (tostarp galveno smadzeņu, smadzenīšu un iegareno smadzeņu / smadzeņu tilta izgriezumi)	Aizkuņģa dziedzeris
Aklā zarna	Epitēlijķermenīši
Lokzarna	Perifērais nervs (sēžas nervs vai tibiālais nervs, vēlams, muskuļa tuvumā)
Divpadsmitpirkstu zarna	Hipofīze
[Sēklinieku piedēkļi]	Prostata
[Acis (tīklene, acs nervs) un plakstiņi]	Taisnā zarna
Augšstilbs un pakājkājas ceļa locītava	Siekalu dziedzeri
Žultspūslis (ja ir)	Sēklas pūslīši
[Hardera dziedzeri]	Āda
Sirds	Muguras smadzenes (kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona smadzenes)
Līkumainā zarna	Liesa
Tukšā zarna	Krūšu kauls
Nieres	Kuņģis
[Asaru dziedzeri (ārpusorbītas)]	Zobi
Balsene (trīs līmeņi, ieskaitot uzgāmura pamatni)	Sēklinieki
Aknas	Tīms
Plauša (visas daivas vienā līmenī ar galvenajiem bronhiem)	Vairogdziedzeris
Plaušas vārtu limfmezgli, sevišķi testējamām ķīmiskām vielām no mazšķīstošām daļiņām. Padziļinātiem izmeklējumiem un/vai pētījumiem, kuros uzmanība pievērsta imunoloģiskajiem aspektiem, var apsvērt, vai ņemt papildu limfmezglus, piemēram, limfmezglus no mediastinālā, kakla/zemžokļu un/vai aurikulārā apvidus.	[Mēle]
Limfmezgli (distālie no vārtiem)	Traheja (vismaz divi līmeņi, ieskaitot vienu garengriezumu caur elpvada ķīli elpvada dakšas vietā un vienu šķērsriezumu)
Piena dziedzeris (sievšķais)	[Urīnvads]
Muskulis (augšstilba)	[Urīnizvadkanāls]
Aizdegunes audi (vismaz četri līmeņi; viens līmenis, kurā ietilpst aizdegunes kanāls un ar degunu saistītie limfātiskās sistēmas audi (NALT)).	Urīnpūslis
	Dzemde
	Mērķorgāni
	Visi makroskopiskie bojājumi un masas rādījumi

43. Lai saglabātu plaušu struktūru, plaušas jāizņem neskartas, jānosver un jāapstrādā ar piemērotu fiksācijas šķīdumu spiedienā, ko rada 20–30 cm dziļš ūdens (5). Visu daivu, arī galveno bronhu, izgriezumā jāievāc vienā līmenī, bet, ja veic plaušu lavāžu, neskatotā daiva ir jāizgriež trijos līmeņos (tās nedrīkst būt sēriju sekcijas).

44. Aizdegunes audi ir jāizmeklē vismaz četros līmeņos, no kuriem vienam ir jāaptver aizdegunes kanāls (5) (6) (7) (8) (9), lai varētu pienācīgi izmeklēt plakano epitēliju, pārejas epitēliju (elpceļu bezskropstīnepitēliju), elpceļu epitēliju (elpceļu skropstīnepitēliju) un ožas epitēliju, un drenējošos limfātiskos audus (NALT) (10) (11). Balsene ir jāizmeklē trijos līmeņos, no kuriem vienam ir jāaptver uzgāzuma pamatne (12). Ir jāizmeklē vismaz divi trahejas līmeņi, ieskaitot vienu garengriezumu caur elpvada ķīli elpvada dakšas vietā un vienu šķēsgriezumu.

HISTOPATOLOĢIJA

45. Visu 2. tabulā uzskaitīto orgānu un audu histopatoloģiska izvērtēšana jāizdara kontrolgrupai, augstākās koncentrācijas grupai, kā arī visiem dzīvniekiem, kas nobeidzas vai tiek nonāvēti pētījuma laikā. Īpaša uzmanība ir jāpievērš elpošanas sistēmai, mērķorgāniem un makroskopiskiem bojājumiem. Tie orgāni un audi, kuriem augstākās koncentrācijas grupā ir novēroti bojājumi, ir jāizmeklē visām grupām. Lai pierādītu nepārprotamu atbildes reakciju uz koncentrāciju, pētījuma vadītājs var izvēlēties veikt histopatoloģisku izvērtēšanu papildu grupām. Ja izmanto satelītgrupu (atgriezeniskuma grupu), histopatoloģiska izvērtēšana ir jāizdara visiem audiem un orgāniem, uz kuriem vielu saņēmušajās grupās ir konstatēta ietekme. Ja augstākās koncentrācijas grupā ir novērots pārmērīgi daudz agrīnas nobeigšanās gadījumu vai citas problēmas, kas mazina datu būtiskumu, ir histopatoloģiski jāizmeklē nākamā zemāka koncentrācijas līmeņa grupa. Jāmēģina rast korelāciju starp pilnas autopsijas datiem un mikroskopijas rezultātiem.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

46. Ir jāsniedz dati par katra dzīvnieka ķermeņa svaru, barības patēriņu, klīnisko patoloģiju, smagu patoloģiju, orgānu svaru un histopatoloģiju. Klīnisko novērojumu dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot to dzīvnieku skaitu, kuri izmantoti, to dzīvnieku skaitu, kuriem parādījušās noteiktas toksicitātes pazīmes, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā atrasti nobeigušies vai ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ, atsevišķu dzīvnieku nāves iestāšanās laiku, toksiskās ietekmes raksturu, norisi laikā un atgriezeniskumu, kā arī autopsijas atradi. Gan kvantitatīvie, gan papildu rezultāti ir jānovērtē ar attiecīgu statistikas metodi. Var izmantot jebkuru vispārpieņemtu statistikas metodi. Statistikas metodes ir jāizvēlas pētījuma plānošanas laikā.

Testēšanas pārskats

47. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testa dzīvnieki un dzīvnieku turēšana:

- apraksts par apstākļiem būros, arī dzīvnieku skaits (vai skaita maiņa) katrā būrī, pakaiši, temperatūra un relatīvais mitrums, apgaismojuma ilgums un informācija par uzturu,
- izmantotās sugas/līnija un pamatojums, kādēļ ir izmantota cita suga, kas nav žurka. Var norādīt avotu un vēsturiskos datus, ja tie ir par dzīvniekiem, kas pakļauti tādai pašai ekspozīcijai, turēšanas apstākļiem un nebarošanas periodiem,
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,
- nejaušināšanas metode,
- jebkāda pirmstesta sagatavošana, ieskaitot uzturu, karantīnu un slimības ārstēšanu.

Testējamā ķīmiskā viela:

- fizikālā daba, tīrība un attiecīgos gadījumos arī fizikālķīmiskās īpašības (ieskaitot izomerizāciju),
- identifikācijas dati un reģistrācijas numurs Ķīmijas referatīvajā žurnālā (CAS), ja zināms.

Nesēji:

- nesējielas izmantošanas pamatojums un nesējielas izvēles pamatojums (ja tā nav ūdens),
- vēsturiski vai vienlaicīgi dati, kas pierāda, ka nesējiela neietekmē pētījuma rezultātu.

Inhalācijas kamera:

- inhalācijas kameras sīks apraksts, ieskaitot tilpumu un shēmu,
- dzīvnieku ekspozīcijai un atmosfēras ģenerēšanai izmantotā aprīkojuma izcelsme un apraksts,
- temperatūras, mitruma, daļiņu lieluma un faktiskās koncentrācijas mērīšanas aprīkojums,
- kondicionēšanai izmantotai gaisa avots un sistēma,
- metodes, ko izmanto homogēnas testa atmosfēras nodrošināšanas aprīkojuma kalibrēšanai,
- spiediena starpība (pozitīva vai negatīva),
- ekspozīcijas portu skaits kamerā (deguna ekspozīcija); dzīvnieku atrašanās vieta kamerā (visa ķermeņa ekspozīcija),
- testa atmosfēras stabilitāte,
- temperatūras un mitruma sensoru atrašanās vieta un testa atmosfēras paraugu ņemšana kamerā,
- pievadītā un aizvadītā gaisa apstrāde,
- gaisa caurplūduma rādītāji, gaisa caurplūdums uz vienu ekspozīcijas portu (deguna ekspozīcija) vai dzīvniek-slodze/kamera (visa ķermeņa ekspozīcija),
- laiks, kas vajadzīgs, lai inhalācijas kamerā sasniegtu līdzsvaru (t_{95}),
- tilpuma nomaiņu skaits stundā,
- mērīšanas ierīces (attiecīgā gadījumā).

Ekspozīcijas dati:

- pamatojums par mērķkoncentrācijas izvēli galvenajam pētījumam,
- nominālās koncentrācijas (inhalācijas kamerā ģenerētās testējamās ķīmiskās vielas kopējā masa, kas dalīta ar kamerai caurplūdušā gaisa tilpumu),
- testējamās ķīmiskās vielas faktiskās koncentrācijas, kas ievāktas no dzīvnieka inhalācijas zonas. Maisījumiem, kas veido heterogēnas fizikālās formas (gāzes, tvaiki, aerosoli), katru var analizēt atsevišķi,
- visas gaisa koncentrācijas pārskatā ir jānorāda masas vienībās (mg/l, mg/m³ utt.), nevis tilpuma vienībās (ppm, ppb utt.),
- daļiņu sadalījums pēc lieluma, masas vidējais aerodinamiskais diametrs (MMAD) un ģeometriskā standartnovirze (σ_g), tostarp to aprēķināšanas metodes. Ziņojumā jāietver atsevišķas daļiņu lieluma analīzes.

Testēšanas apstākļi:

- sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas preparātu, arī par visām procedūrām, kas izmantotas cietu materiālu daļiņu lieluma samazināšanai vai testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu sagatavošanai,
- apraksts (vēlams, kopā ar shēmu) par iekārtu, ko izmanto, lai ģenerētu testa atmosfēru un dzīvniekus pakļautu tās iedarbībai,
- apraksts par aprīkojumu, ko izmanto, lai uzraudzītu kameras temperatūru, mitrumu un gaisa plūsmu (t. i., kalibrēšanas līknes attīstība),
- apraksts par aprīkojumu, ko izmanto, lai paņemtu paraugus nolūkā noteikt koncentrāciju kamerā un daļiņu sadalījumu pēc lieluma,
- sīka informācija par izmantoto ķīmiski analītisko metodi un metodes validēšanu (ieskaitot to, cik efektīva ir testējamās ķīmiskās vielas atgūšana no paraugu ņemšanas vides),

- nejausināšanas metode, ar kādu dzīvniekus iedala testa un kontroles grupās,
- sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti (ieskaitot uztura veidu/avotu, ūdens avotu),
- testa koncentrāciju izvēles pamatojums.

Rezultāti:

- tabula ar kameras temperatūru, mitrumu un gaisa plūsmu,
- tabula ar datiem par kameras nominālo un faktisko koncentrāciju,
- tabula ar datiem par daļiņu lielumu, ieskaitot analītisko paraugu ņemšanas datus, daļiņu sadalījumu pēc lieluma un MMAD un σ_g aprēķinus,
- tabula ar datiem par katra dzīvnieka atbildes reakciju un koncentrācijas līmeni (t. i., dzīvnieki, kam izpaudušās toksitātes pazīmes, arī mirstība; ietekmes veids, ietekmes smagums, sākumpunkts un ilgums),
- tabula ar datiem par katra dzīvnieka svaru,
- tabula ar datiem par barības patēriņu,
- tabula ar klīniskās patoloģijas datiem,
- katra dzīvnieka autopsijas atrade un histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultāti, ja pieejami.

Rezultātu interpretācija un komentāri:

- īpaši svarīgi ir aprakstīt metodes, kas izmantotas, lai nodrošinātu, ka ir apmierināti šīs testa metodes kritēriji, piemēram, attiecībā uz robežkoncentrācijām vai daļiņu lielumu,
- ir jāapspriež daļiņu ieelpojamība, ņemot vērā kopējos konstatējumus, it sevišķi, ja nav izdevies nodrošināt atbilstību daļiņu lieluma kritērijiem,
- pētījuma kopējā novērtējumā ir jānorāda nominālās un faktiskās koncentrācijas noteikšanai izmantoto metožu saskaņotība, kā arī faktiskās koncentrācijas attiecība pret nominālo,
- jāapspriež, kāds varētu būt nāves cēlonis un galvenais iedarbības veids (sistēmisks vai vietējs),
- jāsniedz paskaidrojums, ja, pamatojoties uz ESAO *Guidance Document on Humane Endpoints* (3) kritērijiem, bija humāni jānonāvē dzīvnieki, kas cieta sāpes vai izrādīja smagu un ilgstošu ciešanu pazīmes,
- jānorāda mērķorgāns(-i),
- jānosaka NOAEL un LOAEL.

LITERATŪRA

- (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. gads). 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.
- (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) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006, OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJA

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

B.30. HRONISKĀS TOKSICITĀTES PĒTĪJUMI

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga Ekonomiskās sadarbības un attīstības organizācijas (ESAO) Testēšanas norādījumiem 452 (TG) (2009. gads). Sākotnējos TG 452 pieņēma 1981. gadā. Šīs pārskatītās B.30. testēšanas metodes izstrādi uzskatīja par nepieciešamu, lai atspoguļotu jaunāko attīstību dzīvnieku labturības un regulatīvo prasību jomā (1) (2) (3) (4). Šīs B.30. testēšanas metodes atjaunināšana ir veikta paralēli šā pielikuma B.32. nodaļas "Kancerogenitātes pētījumi" pārskatīšanai un šā pielikuma B.33. nodaļas "Apvienotie hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumi" pārskatīšanai, lai no pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem iegūtu papildu informāciju un sniegtu detalizētāku informāciju par devu izvēli. Šī testēšanas metode ir izstrādāta, lai to varētu izmantot daudzu dažādu ķīmisko vielu, tostarp pesticīdu un rūpniecisko ķīmisko vielu, testēšanai.
2. Lielāko daļu hroniskās toksicitātes pētījumu veic ar graužēju sugām, tādēļ šī testēšanas metode ir pirmām kārtām paredzēta pētījumiem ar šīm sugām. Ja šādos pētījumos ir vajadzīgs izmantot sugas, kas nav graužēji, ar attiecīgiem grozījumiem var piemērot arī šajā testēšanas metodē noteiktos principus un procedūras kopā ar principiem un procedūrām, kuras noteiktas šā pielikuma B.27. nodaļā "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav graužēji" (5), kā noteikts ESAO *Guidance Document No. 116 on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (6).
3. Trīs galvenie ievadīšanas ceļi, ko izmanto hroniskās toksicitātes pētījumos, ir orālais ceļš, āriņa aplikācija un inhalācija. Ievadīšanas ceļu izvēlas atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām, kā arī no tā, kādā ceļā cilvēks galvenokārt nonāk saskarē ar šo vielu. Papildu informācija par ekspozīcijas ceļa izvēli ir sniegta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6).
4. Šajā testēšanas metodē galvenā uzmanība pievērsta orālajam ceļam, kas ir hroniskās toksicitātes pētījumos visbiežāk izmantotā pieeja. Lai gan cilvēku veselības riska novērtēšanai un/vai saskaņā ar konkrētiem tiesiskajiem regulējumiem var būt nepieciešami arī ilgtermiņa hroniskās toksicitātes pētījumi ar āriņas aplikācijas vai inhalācijas ekspozīciju, abi minētie ekspozīcijas ceļi tehniski ir diezgan sarežģīti. Šādus pētījumus plāno individuāli, lai gan šeit izklāstīto testēšanas metodi hroniskās toksicitātes novērtēšanai un izvērtēšanai ar orālu ievadīšanu varētu būt pamatā inhalācijas un/vai āriņas aplikācijas pētījumu protokola ieteikumiem par ievadīšanas periodiem, klīniskajiem un patoloģijas parametriem utt. Ir pieejami ESAO norādījumi par testējamo ķīmisko vielu ievadīšanu inhalācijas (6) (7) un āriņas aplikācijas ceļā (6). Plānojot ilgtermiņa pētījumus ar inhalācijas ekspozīciju, ir jāizmanto šā pielikuma B.8. nodaļa (8) un B.29. nodaļa (9), kā arī ESAO *Guidance Document on acute inhalation testing* (7). Ja veic testus ar āriņu aplikāciju, jāizmanto šā pielikuma B.9. nodaļa (10).
5. Hroniskās toksicitātes pētījums nodrošina informāciju par iespējamo veselības apdraudējumu, ko varbūtīgi radīt atkārtotai ekspozīcijai, kura ilgst būtisku izmantoto sugu mūža daļu. Pētījums nodrošinās informāciju par testējamās ķīmiskās vielas toksisko ietekmi, kā arī norādīs mērķorgānus un akumulācijas iespējamību. Pētījumā var arī iegūt aplēses par līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme un kuru var izmantot, lai noteiktu cilvēka ekspozīcijas drošuma kritērijus. Ir uzsvērts arī vajadzība izdarīt rūpīgus dzīvnieku klīniskos novērojumus, lai iegūtu iespējami vairāk informācijas.
6. Pēc šīs testēšanas metodes veicamo pētījumu mērķi ir citu starpā šādi:
 - noteikt testējamās ķīmiskās vielas hronisko toksicitāti,
 - noteikt mērķorgānus,
 - raksturot devas un atbildes reakcijas sakarību,
 - noteikt līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme (NOAEL), vai etalondevas (BMD) noteikšanas sākumpunktu,
 - prognozēt hroniskās toksicitātes ietekmi līmeņos, kādos paredzama cilvēka ekspozīcija,
 - sagādāt datus testa hipotēzēm attiecībā uz iedarbības veidu (6).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

7. Lai pētījuma izstrādi vērstu uz efektīvāku hroniskās toksicitātes potenciāla testēšanu un lai līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu, novērtējot un izvērtējot testējamās ķīmiskās vielas toksiskās īpašības, testēšanas laboratorijai pirms pētījuma veikšanas ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu. Informācija, kas palīdzēs pētījuma plāna izstrādē, aptver testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu informāciju par iedarbības veidu; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes testu rezultātus; paredzētos lietošanas veidus un iespējamo cilvēka ekspozīciju; pieejamos (Q)SAR datus un toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām vielām; pieejamos toksikokinētiskos datus (vienreizējas devas, kā arī atkārtotas devas kinētika, ja šādi dati ir pieejami) un datus, kas iegūti citos atkārtotas ekspozīcijas testos. Hroniskās toksicitātes noteikšana jāveic tikai pēc tam, kad atkārtotas devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos ir iegūta sākotnējā informācija par toksicitāti. Novērtējot konkrētas testējamās ķīmiskās vielas iespējami nelabvēlīgo ietekmi uz veselību, par šā procesa sastāvdaļu jāuzskata arī hroniskās toksicitātes testēšana ar vairākpasmi pieeju (11) (12) (13) (14).
8. Pirms pētījuma sākšanas ir jānosaka rezultātu analizēšanai piemērotākās statistikas metodes, ņemot vērā eksperimenta plānu un mērķus. Ir arī jāapsver, vai statistikas dati nebūtu jākorrigē attiecībā uz izdzīvošanu un vai tajos nebūtu jāietver analīze, ko izmanto gadījumiem, kuros attiecībā uz vienu vai vairākām grupām testu izbeidz priekšlaicīgi. Norādījumi par attiecīgām statistikas analīzēm un galvenās atsaucis uz starptautiski pieņemtām statistikas metodēm ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6), kā arī *Guidance Document No. 35 on the analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies* (15).
9. Veicot hroniskās toksicitātes pētījumu, vienmēr jāievēro pamatprincipi un apsvērumi, kas sniegti *ESAO Guidance Document No. 19 on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (16), it sevišķi šā dokumenta 62. punkts. Šajā punktā ir noteikts, ka: "Pētījumos ar atkārtotām devām, ja dzīvnieks uzrāda klīniskas progresīvas pazīmes, kas noved pie stāvokļa turpmākas pasliktināšanās, ir jāpieņem informēts lēmums par to, vai šāds dzīvnieks ir humāni jānonāvē vai ne. Pieņemot lēmumu, jāapsver tās informācijas vērtība, ko varētu sniegt konkrētā dzīvnieka turpmāka uzturēšana pētījumā, attiecībā pret šā dzīvnieka vispārīgo stāvokli. Ja tiek pieņemts lēmums dzīvnieku paturēt testā, pēc vajadzības novērojumi ir jāveic biežāk. Var arī būt iespējams (negatīvi neietekmējot testa mērķi) uz laiku pārtraukt devas ievadīšanu, ja tas mazinās sāpes vai ciešanas, vai samazināt testa devu."
10. Detalizēti norādījumi un diskusija par devas izvēles principiem hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumiem ir pieejami Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6), kā arī divās *International Life Sciences Institute* publikācijās (17) (18). Devas izvēles pamatstratēģija ir atkarīga no pētījuma galvenā mērķa vai mērķiem (6. punkts). Izvēloties attiecīgus devu līmeņus, ir jāpanāk līdzsvars starp riska novērtēšanu, no vienas puses, un atbildes reakciju uz zemu devu raksturošanu un šo reakciju būtiskumu, no otras puses. Tas ir sevišķi būtiski situācijā, kad ir jāveic apvienotais hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījums (šā pielikuma B.33. nodaļa) (11. punkts).
11. Jāapsver arī iespēja veikt apvienoto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu (šā pielikuma B.33. nodaļa), nevis atsevišķu hroniskās toksicitātes pētījumu (šī B.30. testēšanas metode) un atsevišķu kancerogenitātes pētījumu (šā pielikuma B.32. nodaļa). Salīdzinājumā ar divu atsevišķu pētījumu veikšanu apvienotais tests laika un izmaksu ziņā ir efektīvāks, un ne hroniskajā posmā, ne kancerogenitātes posmā nav pazemināta datu kvalitāte. Tomēr, ja veic apvienoto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu (šā pielikuma B.33. nodaļa), ir rūpīgi jāapsver devu izvēles principi (9. un 20.–25. punkts), un tiek arī atzīts, ka saskaņā ar konkrētiem tiesiskajiem regulējumiem var būt vajadzīgi atsevišķi pētījumi.
12. Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas šīs nodaļas beigās un Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6).

TESTA PRINCIPS

13. Testējamo ķīmisko vielu ievada pakāpeniskās devās katru dienu vairākām eksperimentālo dzīvnieku grupām, parasti 12 mēnešus, lai gan var izraudzīties arī garākus vai īsākus periodus atkarībā no regulatīvajām prasībām (sk. 33. punktu). Izvēlas periodu, kas ir pietiekami ilgs, lai jebkāda kumulatīvas toksicitātes ietekme kļūtu pamanāma bez geriatrisku pārmaiņu maldinošajām sekām. Ja izraugās ekspozīcijas periodu, kas nav 12 mēneši, tas jāpamato, it sevišķi, ja šis periods ir mazāks. Testējamo ķīmisko vielu parasti ievada orāli, lai gan var būt piemērota arī testēšana ar inhalāciju vai āriņu aplikāciju. Pētījuma plāns var ietvert arī vienu vai vairākas dzīvnieku nonāvēšanas testa laikā, piemēram, trešajā un sestajā mēnesī, un var tikt ietvertas papildu dzīvnieku grupas, lai šim apstāklim pielāgotos (sk. 19. punktu). Vietas ievadīšanas laikā rūpīgi novēro, vai dzīvniekiem neparādās toksicitātes pazīmes. Dzīvniekiem, kuri testa laikā nobeidzas vai kurus tā laikā nonāvē, izdara autopsiju, un testa beigās izdzīvojušos dzīvniekus nonāvē un tiem izdara autopsiju.

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

14. Šī testēšanas metode galvenokārt attiecas uz hroniskās toksicitātes novērtēšanu un izvērtēšanu grauzējos (sk. 2. punktu), lai gan tiek atzīts, ka daži tiesiskā regulējuma režīmi var prasīt tādus pašus pētījumus ar sugām, kas nav grauzēji. Sugu izvēle ir jāpamato. Ja jāveic hroniskās toksicitātes pētījumi ar sugām, kas nav grauzēji, šie pētījumi jāplāno un jāīsteno, balstoties uz principiem, kuri izklāstīti šajā testēšanas metodē, kā arī šā pielikuma B.27. nodaļā "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav grauzēji" (5). Papildu informācija par sugu un līnijas izvēli ir sniegta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6).
15. Šajā testēšanas metodē ieteicamā suga ir žurka, lai gan var izmantot arī citas grauzēju sugas, piemēram, peles. Žurkas un peles ir bijuši ieteicami eksperimentu modeļi, jo tām ir relatīvi īss mūžs, tās plaši izmanto farmakoloģiskos un toksikoloģiskos pētījumos, tām viegli inducēt audzēju, un tām ir pietiekami daudz līniju ar izpētītām īpašībām. Pateicoties šīm īpašībām, ir pieejama plaša informācija par šo sugu fizioloģiju un patoloģiju. Ir jāizmanto jauni, veseli pieauguši dzīvnieki, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Hroniskās toksicitātes pētījums jāveic ar tās pašas līnijas un izcelsmes dzīvniekiem, kādas izmantotas īsākā(-os) provizoriskā(-os) toksicitātes pētījumā(-os). Mātes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas.

Turēšanas un barošanas apstākļi

16. Dzīvniekus būros var turēt atsevišķi vai nelielās viendzimuma grupās. Turēšana atsevišķi ir jāapsver tikai tad, ja tas ir zinātniski pamatoti (19) (20) (21). Būrus izvieto tā, lai iespējami mazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Temperatūrai eksperimentālo dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22°C ($\pm 3^{\circ}\text{C}$). Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams, ne vairāk kā 70 %, jācenšas nodrošināt mitrumu 50–60 % robežās. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Uzturam ir jāatbilst visām testā izmantotās sugas uzturvajadzībām, un tādu uztura piesārņotāju, arī pesticīdu atlieku, noturīgu organisko piesārņotāju, fitoestrogēnu, smago metālu un mikotoksīnu, kas varētu ietekmēt testa rezultātu, saturam jābūt iespējami zemākam. Periodiski, vismaz pētījuma sākumā un tad, kad mainās izmantotā sērija, ir jāsaprotavo un galazīpojuma jāietver analītiska informācija par uzturvielu un uztura piesārņojuma līmeņiem. Tāpat ir arī jāsniedz analītiska informācija par pētījumā izmantoto dzeramo ūdeni. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, uztura izvēli var ietekmēt nepieciešamība nodrošināt gan piemērotu testējamās ķīmiskās vielas pieejamību, gan arī nodrošināt dzīvnieku uzturvajadzības.

Dzīvnieku sagatavošana

17. Ir jāizmanto veseli dzīvnieki, kuri ir aklimatizēti laboratorijas apstākļos vismaz septiņas dienas un ar kuriem iepriekš nav veiktas eksperimentālas procedūras. Grauzēju gadījumā devu došana dzīvniekiem ir jāsāk iespējami drīz tūlīt pēc dzīšanas un aklimatizācijas, kā arī, vēlams, pirms dzīvnieki sasniedz astoņu nedēļu vecumu. Testa dzīvniekiem norāda sugu, līniju, izcelsmi, dzimumu, svaru un vecumu. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt $\pm 20\%$ no visu pētījumā iesaistīto dzīvnieku vidējā svara, kas noteikts katram dzimumam atsevišķi. Dzīvnieki kontroles un testa grupās ir jāiedala nejaušināti. Kad ir veikta nejaušināta izvēle, katra dzimuma grupās vidējais ķermeņa svars nedrīkst būtiski atšķirties. Ja pastāv statistiski būtiskas atšķirības, nejaušināta izvēle ir jāatkārto, ja tas ir iespējams. Katram dzīvniekam jāpiešķir unikāls identifikācijas numurs, kā arī šis dzīvnieks ir noturīgi jāmarķē ar šo numuru, izdarot tetovējumu, implantējot mikročipu vai izmantojot citu piemērotu metodi.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

18. Jāizmanto abi dzimumi. Jāizmanto pietiekams skaits dzīvnieku, lai pētījuma beigās katrā grupā būtu pieejams pietiekami daudz dzīvnieku rūpīgas bioloģiskas un statistiskas izvērtēšanas veikšanai. Grauzēju gadījumā katrā grupā jāizmanto vismaz 20 katra dzimuma dzīvnieki katram devas līmenim, savukārt tādu dzīvnieku gadījumā, kas nav grauzēji, katrā grupā ieteicams izmantot vismaz četriem katra dzimuma dzīvniekus. Pētījumos ar pelēm var būt nepieciešami papildu dzīvnieki katras devas grupā, lai varētu veikt visus vajadzīgos hematoloģiskos izmeklējumus.

Dzīvnieku nonāvēšana testa laikā, satelītgrupas un indikatordzīvnieki

19. Lai iegūtu informāciju par toksikoloģisko pārmaiņu norisi un mehānistisku informāciju, ja tas ir zinātniski pamatoti, pētījumā var paredzēt dzīvnieku nonāvēšanu testa laikā (vismaz 10 dzīvnieki no katra dzimuma katrā grupā), piemēram, sestajā mēnesī. Ja šāda informācija jau ir pieejama no iepriekšējiem atkārtotās devas toksicitātes pētījumiem par testējamo ķīmisko vielu, dzīvnieku nonāvēšana testa laikā var nebūt zinātniski pamatota. Var ietvert arī satelītgrupas, lai pārbaudītu jebkādu pētītās testējamās ķīmiskās vielas radīto toksikoloģisko pārmaiņu atgriezeniskumu; šīs grupas parasti nodrošina tikai pētījuma augstākajam devas līmenim un

kontrolgrupai. Ja vajadzīgs, var izmantot papildu indikatordzīvnieku grupu (parasti 5 dzīvnieki no katra dzimuma), lai pētījuma laikā pārraudzītu slimības stāvokli (22). Ja ir plānota dzīvnieku nonāvēšana testa laikā vai satelītkontroles vai indikatorgrupas izmantošana, pētījuma plānā paredzētais dzīvnieku skaits ir jāpalielina par to skaitu, ko plānots nonāvēt pirms pētījuma beigām. Šiem dzīvniekiem parasti ir jāveic tādi paši novērojumi – tostarp jānovēro ķermeņa svars, barības/ūdens patēriņš, jāveic hematoloģiskie un klīniski bioķīmiskie mērījumi, kā arī patoloģiskie izmeklējumi – kā dzīvniekiem galvenā pētījuma hroniskās toksicitātes posmā, lai gan var arī paredzēt (grupām, ko plānots nonāvēt testa laikā), ka mērījumi jāveic tikai attiecībā uz tādiem īpašiem, svarīgiem parametriem kā neitrotoksicitāte vai imūntoksicitāte.

Devu grupas un dozējums

20. Norādījumi par devu izvēli un intervāliem starp devu līmeņiem visos aspektos ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6). Jāizmanto vismaz trīs devu līmeņi, un jānodrošina paralēla kontrole, izņemot gadījumu, ja veic pieļaujamā daudzuma testu (sk. 27. punktu). Devu līmeņus parasti nosaka, pamatojoties uz īsākiem atkārtotās devas vai diapazona noteikšanas pētījumiem un ņemot vērā visus esošos toksikoloģiskos un toksikokinētiskos datus, kas ir pieejami par testējamo ķīmisko vielu vai radniecīgajām ķīmiskajām vielām.
21. Ja testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskās īpašības vai bioloģiskā iedarbība to neierobežo, augstākais devas līmenis parasti jāizvēlas ar nolūku noskaidrot galvenos mērķorgānus un toksisko ietekmi, vienlaikus izvairoties radīt ciešanas, smagas toksicitāti, saslimstību un mirstību. Vienlaikus ņemot vērā turpmāk 22. punktā izklāstītos faktorus, augstākais devas līmenis ir jāizvēlas tāds, lai tas izraisītu toksicitātes pazīmes, kuras, piemēram, apliecina ķermeņa svara pieauguma samazinājums (apm. 10 %).
22. Tomēr atkarībā no pētījuma mērķiem (sk. 6. punktu) var izvēlēties augstāko devas līmeni, kas ir zemāks par devu, kura nodrošina toksicitātes pazīmes, piemēram, ja deva izraisa būtisku nelabvēlīgu ietekmi, kas tomēr īpaši neietekmē mūža ilgumu vai ķermeņa svaru. Augstākais devas līmenis nedrīkstētu pārsniegt 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā (robeždeva; sk. 27. punktu).
23. Devu līmeņus un intervālus starp devu līmeņiem var izvēlēties tāds, lai varētu noteikt devas un atbildes reakcijas sakarību un NOAEL vai citus paredzamos pētījuma rezultātus, piemēram, BMD (sk. 25. punktu) zemākā devas līmeņa gadījumā. No faktoriem, kas ir jāapsver, nosakot mazākās devas, minams gaidāmais devas un atbildes reakcijas sakarības līknes slīpums un devas, kuru gadījumā var notikt svarīgas metabolisma vai toksiskās iedarbības veida pārmaiņas, ja ir gaidāms kāds sliekšnis vai ja ir gaidāms sākumpunkts zemu devu ekstrapolācijai.
24. Izraudzītie intervāli starp devu līmeņiem būs atkarīgi no testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, un šajā testēšanas metodes aprakstā tos nevar norādīt, taču lejupejošu devu līmeņu noteikšanā labus testa rezultātus nereti nodrošina divkārtīgi līdz četrkārtīgi intervāli, un nereti ir ieteicams pievienot 4. testa grupu, nevis izmantot ļoti lielus intervālus starp dozējumiem (piemēram, pārsniedzot koeficientu 6–10). Parasti jāizvairās no tādu koeficientu izmantošanas, kas pārsniedz 10, un, ja tie tiek izmantoti, tas jāpamato.
25. Kā plašāk izklāstīts Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6), izvēloties devas, ir jāņem vērā šādi aspekti:
 - devas un atbildes reakcijas sakarības zināmās vai prognozētās nelinearitātes vai liekuma punkti,
 - toksikokinētika un tādu devu diapazoni, kuru gadījumā ir vai nav vērojama metaboliskā inducēšanās, piesātināšanās vai nelinearitāte starp ārēji un iekšēji uzņemtajām devām,
 - jau esoši bojājumi, ietekmes marķieri vai svarīgu, pamatā esošu bioloģisko procesu norises rādītāji,
 - iedarbības veida svarīgākie (vai paredzētie) aspekti, piemēram, devas, kuru gadījumā sākas citotoksicitāte, mainās hormonu līmeņi, tiek nomākti homeostatiskie mehānismi utt.,
 - devas un atbildes reakcijas sakarības līknes reģioni, kuros vajadzīgas sevišķi pamatīgas aplēses, piemēram, paredzamās BMD vai prognozētā sliekšņa diapazonā,
 - apsvērumi par paredzamajiem cilvēka ekspozīcijas līmeņiem.
26. Kontrolgrupa ir vielu nesāņēmusi grupa vai nesējvielas kontroles grupa, ja testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai izmanto nesējvielu. Izņemot testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanu, ar kontrolgrupas dzīvniekiem jārikojas tieši tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem. Ja izmanto nesējvielu, kontrolgrupa saņem lielāko devu grupām izmantoto nesējvielas tilpumu. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu un ja uztura garšas dēļ būtiski samazinās tā patēriņš, par piemērotāku kontrolgrupu var būt lietderīgi izmantot papildu grupu, ko baro tieši tāpat.

27. Ja, pamatojoties uz provizoriskos pētījumos iegūto informāciju, var prognozēt, ka testā ar vienu vielas devas līmeni, kas ir vismaz 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā, izmantojot šim pētījumam aprakstītās procedūras, netiks novērota nelabvēlīga ietekme, un ja, pamatojoties uz datiem par strukturāli radniecīgām ķīmiskām vielām, var uzskatīt, ka viela nebūs toksiska, pilnu pētījumu ar trīs devu līmeņiem var atzīt par nevajadzīgu. Var piemērot ierobežojumu 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā, izņemot gadījumu, ja cilvēka ekspozīcija liecina, ka jāizmanto augstāks devas līmenis.

Devu sagatavošana un testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana

28. Testējamo ķīmisko vielu parasti ievada orāli ar uzturu vai dzeramo ūdeni vai ar mākslīgo barošanu. Papildu informācija par ievadīšanas ceļiem un metodēm ir sniegta Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6). Ievadīšanas ceļš un metode ir atkarīgi no pētījuma mērķa, testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, tās biopieejamības un cilvēka ekspozīcijas galvenā ceļa un metodes. Izraudzītais ievadīšanas ceļš un metode ir jāpamato. Dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ ievadīt ar mākslīgo barošanu parasti izvēlas tikai tādu preparātu, attiecībā uz kuriem šāds ievadīšanas ceļš un paņēmiens pamatoti raksturo iespējamo cilvēka ekspozīciju (piemēram, farmaceutiskie preparāti). Uzturā vai vidē sastopamas ķīmiskās vielas, arī pesticīdus, parasti ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni. Tomēr dažos gadījumos, piemēram, ekspozīcija darbavietā, piemērotāki var būt citi ievadīšanas ceļi.
29. Ja vajadzīgs, testējamo ķīmisko vielu izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējvielā. Pēc vajadzības ir jāņem vērā šādas nesējvielas un citu piedevu īpašības: ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas absorbciju, izplatīšanos, metabolismu vai aizturi; ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas ķīmiskajām īpašībām, kuras var mainīt tās toksiskās īpašības; kā arī ietekme uz barības un ūdens patēriņu vai dzīvnieku barojumu. Ir ieteicams, ja vien iespējams, vispirms apsvērt ūdens šķīduma/suspensijas izmantošanu, pēc tam eļļas (piemēram, kukurūzas eļļas) šķīdumu/emulsiju un pēc tam iespējamu šķīdināšanu citās nesējvielās. Ja nesējviela nav ūdens, ir jāzina šīs nesējvielas toksiskās īpašības. Ir jābūt pieejamai informācijai par to, kā ievadīšanas metode (piemēram, ar uzturu) ietekmē testējamās ķīmiskās vielas stabilitāti un attiecīgi devu šķīduma vai uztura homogenitāti.
30. Ir svarīgi nodrošināt, lai ķīmiskajām vielām, kuras ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni, testējamās ķīmiskās vielas daudzumi neizjauktu parasto uztura vai ūdens līdzsvaru. Ilgtermiņa toksicitātes pētījumos, kuros veic ievadīšanu ar uzturu, testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija barībā parasti nedrīkstētu pārsniegt augšējo robežu 5 % apmērā no kopējā uztura, lai nepieļautu uztura nelīdzsvarotību. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, var izmantot vai nu nemainīgu koncentrāciju uzturā (mg uz kg uztura vai ppm), vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru (mg uz kg ķermeņa svara), ko aprēķina reizi nedēļā. Izmantotās alternatīvas ir jānorāda.
31. Orālas ievadīšanas gadījumā dzīvniekiem testējamās ķīmiskās vielas devu ievada katru dienu (septiņas dienas nedēļā), parasti 12 mēnešus (sk. arī 33. punktu), lai gan var būt vajadzīgs ilgāks periods atkarībā no regulatīvajām prasībām. Jebkuram citam devu došanas režīmam, piemēram, piecas dienas nedēļā, jābūt pamatotam. Ārīgas aplikācijas gadījumā dzīvniekus testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai parasti pakļauj vismaz sešas stundas dienā septiņas dienas nedēļā, kā noteikts šā pielikuma B.9. nodaļā (10), un tas ilgst 12 mēnešus. Inhalācijas ekspozīciju veic sešas stundas dienā septiņas dienas nedēļā, bet var izmantot arī ekspozīciju piecas dienas nedēļā, ja tas ir pamatoti. Ekspozīcijas periods parasti būs 12 mēneši. Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti grauzēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var koriģēt tā, lai iespējami mazinātu sugai raksturīgās ciešanas. Ja izmanto ekspozīcijas ilgumus, kas ir mazāki par sešām stundām dienā, tas jāpamato. Sk. arī šā pielikuma B.8. nodaļu (8).
32. Ja testējamo ķīmisko vielu dzīvniekiem ievada ar mākslīgo barošanu, tas jā dara ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli vienos un tajos pašos laikos katru dienu. Parasti reizi dienā ievada vienreizēju devu; ja, piemēram, ķīmiskā viela ir lokāls kairinātājs, ikdienas devu var nodrošināt, to ievadot kā dalītu devu (divreiz dienā). Maksimālais šķidrums tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testējamā dzīvnieka lieluma. Tilpumam jābūt iespējami mazākam, un grauzējiem tas parasti nedrīkstētu pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara (22). Testa tilpuma mainība ir jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos tilpums būtu vienāds. Izņēmums ir iespējami kairinošas vai kodīgas ķīmiskās vielas, kas ir jāatskaidra, lai izvairītos no smagas lokālas iedarbības. Ir jāizvairās no tādu koncentrāciju testēšanas, kas, visticamāk, būs kodīgas vai kairinošas kuņģa un zarnu traktam.

Pētījuma ilgums

33. Lai gan šī testēšanas metode pirmām kārtām ir paredzēta kā 12 mēnešu hroniskās testēšanas pētījums, pētījuma plāns pieļauj (un to var izmantot, lai veiktu) īsākus (piemēram, 6 vai 9 mēnešu) vai garākus (piemēram, 18 vai 24 mēnešu) pētījumus atkarībā no konkrētu tiesisko regulējumu prasībām vai konkrētiem mehānistiskiem mērķiem. Ja izraugās ekspozīcijas periodu, kas nav 12 mēneši, tas jāpamato, it sevišķi, ja šis periods ir mazāks. Satelītgrupas, kas ir ietvertas, lai uzraudzītu jebkādu testā ietvertās testējamās ķīmiskās vielas radīto toksikoloģisko pārmaiņu atgriezeniskumu, vismaz 4 nedēļas un ne ilgāk kā vienu trešdaļu kopējā pētījuma laika pēc ekspozīcijas pārtraukšanas ir jātur bez devu ievadīšanas. Papildu norādījumi, tostarp apsvērumi par izdzīvošanu pētījumā, ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (6).

NOVĒROJUMI

34. Visi dzīvnieki ir jāpārbauda, lai konstatētu saslimstību vai mirstību, parasti katras dienas sākumā un beigās, arī nedēļas nogalēs un brīvdienās. Jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi vismaz reizi dienā, vēlams vienā(-os) laikā(-os) katru dienu, ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimuma periodu pēc devas ievadīšanas, ja ir izmantota mākslīgā barošana.
35. Visiem dzīvniekiem vismaz vienreiz pirms pirmās ekspozīcijas (lai vienam un tam pašam dzīvniekam varētu izdarīt salīdzināšanu), pētījuma pirmās nedēļas beigās un reizi mēnesī pēc tam ir jāveic detalizēti klīniskie novērojumi. Novērojumu protokols ir jāparedz tāds, lai iespējami samazinātos variācijas starp atsevišķiem novērotājiem un lai tās nebūtu atkarīgas no testa grupas. Šie novērojumi ir jāveic ārpus dzīvnieka turēšanas būra, ieteicams, standartnožogojumā un visos gadījumos vienos un tajos pašos laikos. Novērojumi ir rūpīgi jāreģistrē, vēlams, izmantojot vērtēšanas sistēmu, ko skaidri noteikusi testēšanas laboratorija. Ir jācenšas nodrošināt, lai novērošanas apstākļu variācijas būtu minimālas. Protokolējamās pazīmēs cita starpā jāiekļauj ādas, apmatojuma, acu, gļotādas, sekrēcijas un izdalījumu, kā arī veģetatīvās aktivitātes pārmaiņas (piemēram, asarošana, piloarekcija, acs zīlītes diametra pārmaiņas un neraksturīga elpošana). Jāreģistrē arī pārmaiņas gaitā, stājā un atbildes reakcijās uz manipulācijām, kā arī kloniskas vai toniskas kustības, stereotipiska (piemēram, pārmērīga apmatojuma laizīšana, atkārtota riņķošana) vai savāda uzvedība (piemēram, pašsakropļošanās, staigāšana atguriski) (24).
36. Ar oftalmoskopu vai citu piemērotu ierīci visiem dzīvniekiem pirms testējamās ķīmiskās vielas pirmās ievadīšanas ir jāveic oftalmoloģiska izmeklēšana. Pētījuma beigās šo izmeklēšanu ieteicams veikt visiem dzīvniekiem vai vismaz dzīvniekiem lielāko devu un kontroles grupās. Ja atklāj ar vielas saņemšanu saistītas pārmaiņas acīs, jāpārbauda visi dzīvnieki. Ja strukturāla analīze vai cita informācija liecina par toksicitāti acīs, jāpalielina acu izmeklēšanas biežums.
37. Ķīmiskām vielām, kurām iepriekšējos atkārtotās devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos ir konstatēts potenciāls radīt neirotoksisku ietekmi, var pēc izvēles novērtēt to izraisītās sensoriskās reakcijas uz dažāda veida kairinājumiem (24) (piemēram, dzirdes, redzes un proprioceptīvajiem kairinājumiem) (25) (26) (27), satveršanas stiprumu (28) un motorisko aktivitāti (29), pirms sāk pētījumu, kā arī ik pa trijiem mēnešiem pēc pētījuma sākšanas līdz 12 mēnešiem (ieskaitot) un arī pētījuma beigās (ja tas ir garāks par 12 mēnešiem). Sīkāki dati par procedūrām, kuras var izmantot, ir sniegti attiecīgajos atsauču avotos. Tomēr var izmantot arī alternatīvas procedūras, nevis tikai tās, kuras minētas atsauču avotos.
38. Ķīmiskām vielām, kurām iepriekšējos atkārtotās devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos ir konstatēts potenciāls radīt imūntoksisku ietekmi, pētījuma beigās šo beigupunktu var pēc izvēles izmeklēt vēl papildus.

Ķermeņa svars, barības/ūdens patēriņš un barības efektivitāte

39. Visi dzīvnieki jānosver vielas ievadīšanas sākumā, pēc tam vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī turpmāk. Barības patēriņa un barības efektivitātes mērījumi ir jāizdara vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam. Ūdens patēriņš ir jāmēra vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam, ja ķīmisko vielu ievada ar dzeramo ūdeni. Jāapsver, vai ūdens patēriņa mērījumus neizdarīt arī pētījumos ar mainītu dzeršanas aktivitāti.

Hematoloģija un klīniskā bioķīmija

40. Pētījumos ar graužējiem hematoloģiskie izmeklējumi ir jāveic vismaz 10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā grupā trešajā, sestajā un divpadsmitajā mēnesī, kā arī pētījuma beigās (ja tas ir garāks par 12 mēnešiem), visu laiku izmantojot vienus un tos pašus dzīvniekus. Lai varētu veikt visus vajadzīgos hematoloģiskos izmeklējumus pelēm (sk. 18. punktu), var būt vajadzīgi satelītkrupas dzīvnieki. Tādu sugu gadījumā, kas nav graužēji, paraugus ņem no mazāka skaita dzīvnieku (piemēram, četri dzīvnieki no katra dzimuma un katrā grupā, ja pētījumu veic ar suņiem) un to dara paraugu ņemšanas laikos testa laikā un pētījuma beigās, kā aprakstīts attiecībā uz graužējiem. Mērījumi trešajā mēnesī ne graužējiem, ne sugām, kas nav graužēji, nav jāveic, ja hematoloģiskie parametri nav uzrādījuši nekādu iedarbību iepriekšējā 90 dienu pētījumā, kurš veikts ar salīdzināmiem devas līmeņiem. Asins paraugi ir jāņem no precīzi norādītās vietas, piemēram, ar sirds punktēšanu vai no retroorbitālā sinusa, dzīvnieku anestezējot.
41. Jāizmeklē šādi parametri (30): leukocītu kopējais un diferenciālais skaits, eritrocītu skaits, trombocītu skaits, hemoglobīna koncentrācija, hematokrits (hematokrīta skaitlis), vidējais korpuskulārais tilpums (MCV), vidējais korpuskulārais hemoglobīns (MCH), vidējā korpuskulārā hemoglobīna koncentrācija (MCHC), protrombīna laiks un aktivizētais daļējais tromboplastīna laiks. Pēc vajadzības atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes var mērīt arī citus hematoloģijas parametrus, piemēram, Heinca ķermenīšus vai citus netipiskas morfoloģijas eritrocītus, vai methemoglobīnu. Kopumā jāpiemēro elastīga pieeja atkarībā no attiecīgās testējamās ķīmiskās vielas novērotās un/vai prognozētās ietekmes. Ja testējamā ķīmiskā viela ietekmē hematopoētisko sistēmu, var norādīt arī retikulocītu skaitu un kaulu smadzeņu citoloģiju, lai gan šie mērījumi parasti nav jāveic.

42. Asins paraugiem, kas iegūti vismaz no 10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā grupā ar tādiem pašiem laika intervāliem, kā norādīts hematoloģiskajiem izmeklējumiem, visu laiku izmantojot vienus un tos pašus dzīvniekus, ir jāveic klīniski bioķīmiskie izmeklējumi, lai noteiktu būtisku toksisku ietekmi audos un tieši ietekmi uz nierēm un aknām. Lai varētu veikt visus vajadzīgos klīniski bioķīmiskos izmeklējumus pelēm, var būt vajadzīgi satelītgrupas dzīvnieki. Tādu sugu gadījumā, kas nav graužēji, paraugus ņem no mazāka skaita dzīvnieku (piemēram, četri dzīvnieki no katra dzimuma un katrā grupā, ja pētījumu veic ar suņiem) un to dara paraugu ņemšanas laikos testa laikā un pētījuma beigās, kā aprakstīts attiecībā uz graužējiem. Mērījumi trešajā mēnesī ne graužējiem, ne sugām, kas nav graužēji, nav jāveic, ja klīniski bioķīmiskie parametri nav uzrādījuši nekādu iedarbību iepriekšējā 90 dienu pētījumā, kurš veikts ar salīdzināmiem devas līmeņiem. Ir ieteicams dzīvniekiem (izņemot peles) pirms asins paraugu ņemšanas uz nakti nedot barību. Jāizmeklē šādi parametri (30): glikoze, urīnviela (urīnvielas slāpekļs), kreatinīns, kopējais olbaltums, albumīns, kalcījs, nātrijs, kālijs, kopējais holesterīns, vismaz divi attiecīgi hepatocelulārās izvērtēšanas testi (alanīna aminotransferāze, aspartāta aminotransferāze, glutamātdehidrogenāze, kopējās žultskābes) (31), kā arī vismaz divi attiecīgi hepatobiliāro novērtējumu testi (alkalīnā fosfatāze, gamma glutamiltransferāze, 5'-nukleotidāze, kopējais bilirubīns, kopējās žultskābes) (31). Pēc vajadzības atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes var mērīt arī citus klīniski bioķīmiskos parametrus, piemēram, triglicerīdus (tukšā dūšā), konkrētus hormonus un holīnesterāzi. Kopumā jāpiemēro elastīga pieeja atkarībā no attiecīgās testējamās ķīmiskās vielas novērotās un/vai prognozētās ietekmes.
43. Urīnānālizē ir jāveic vismaz 10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā grupā, izmantojot paraugus, kas ievākti ar tādiem pašiem intervāliem kā hematoloģiskām un klīniski bioķīmiskām analizēm. Mērījumi trešajā mēnesī nav jāveic, ja urīnānālizē nav uzrādījusi nekādu iedarbību iepriekšējā 90 dienu pētījumā, kurš veikts ar salīdzināmiem devas līmeņiem. Ekspertu ieteikumā par klīniskās patoloģijas pētījumiem norādīti šādi parametri (30): izskats, tilpums, osmolaritāte vai īpatnējais svars, pH, kopējais olbaltums un glikoze. No citiem mērījumiem jāmin ketons, urobilīnogēns, bilirubīns un slēptās asinis. Vajadzības gadījumā, lai paplašinātu novērotās ietekmes izpēti, var izmantot papildu parametrus.
44. Parasti tiek uzskatīts, ka pētījumos ar suņiem pirms vielas ievadīšanas ir vajadzīgi hematoloģiskie un klīniski bioķīmiskie mainīgie izejlielumi, bet pētījumos ar graužējiem tie nav jānosaka (30). Tomēr, ja vēsturiskie izejdati (sk. 50. punktu) ir nepietiekami, jāapsver iespēja šādus datus iegūt.

Patoloģija

Pilna autopsija

45. Visiem pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem parasti veic pilnu, detalizētu autopsiju, ieskaitot ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa dobumu, torakālā dobuma, vēdera dobuma, kā arī šo dobumu satura rūpīgu apskati. Tomēr var arī paredzēt (grupām, ko plānots nonāvēt testa laikā, vai satelītgrupām), ka mērījumi jāveic tikai attiecībā uz tādiem īpašiem, svarīgiem parametriem kā neitoksicitāte vai imūntoksicitāte (sk. 19. punktu). Šiem dzīvniekiem nav jāveic autopsija un sekojošajos punktos aprakstītās turpmākās procedūras. Indikators dzīvniekiem var būt vajadzīga autopsija (vajadzību izskata katrā gadījumā atsevišķi, un lēmumu pieņem pētījuma vadītājs).
46. Orgānu svars ir jānosaka visiem dzīvniekiem, izņemot tos, kas ir izslēgti saskaņā ar 45. punkta pēdējo daļu. Visu dzīvnieku (izņemot dzīvniekus, kas atrasti mirstoši un/vai ir nonāvēti pētījuma laikā) virsnieru dziedzeri, smadzenes, sēklinieku piedēkļi, sirds, nieres, aknas, olnīcas, liesa, sēklinieki, vairogdziedzeris (nosvērts pēc fiksācijas kopā ar epitēlijķermenīšiem) un dzemde ir pēc vajadzības jāatbrīvo no visiem apkārtējiem audiem un, lai izvairītos no izžūšanas, iespējami drīz pēc secēšanas jānoteic natīvais svars. Pētījumā ar pelēm virsnieru dziedzeru svēršana nav obligāta.
47. Fiksācijas šķīdumā, kas ir vispiemērotākais gan konkrētā veida audu izmeklēšanai, gan paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai (32) (kvadrātieķavās norādītie audi nav obligāti) ir jā saglabā turpmāk sarakstā norādītie audi.

Visi makroskopiskie bojājumi	Sirds	Aizkuņģa dziedzeris	Kuņģis (priekškuņģis, dziedzeri)
Virsnieru dziedzeris	Līkumainā zarna	Epitēlijķermenīši	[Zobi]
Aorta	Tukšā zarna	Perifērais nervs	Sēklinieki
Smadzenes (tostarp galveno smadzeņu, smadzenīšu un iegareno smadzeņu / smadzeņu tilta izgriezumā)	Nieres	Hipofīze	Tīms
Aklā zarna	Asaru dziedzeri (ārpusorbītas)	Prostata	Vairogdziedzeris
Dzemes kakls	Aknas	Taisnā zarna	[Mēle]

Koagulācijas dziedzeris	Plaušas	Siekalu dziedzeris	Traheja
Lokzarna	Limfmezgli (gan virspusējie, gan dziļie)	Sēklas pūslīši	Urīnpūslis
Divpadsmitpirkstu zarna	Piena dziedzeris (obligāti mātītēm un, ja iespējams secēt, tēviņiem arī)	Skeleta muskuļu paraugs	Dzemde un dzemdes kakls
Sēklinieku piedēkļi	[Augšējās elpošanas sistēmas orgāni, tostarp deguns, deguna gliemežnīca un paranasālais sinuss]	Āda	[Urīnvads]
Acs (arī tīklene)	Barības vads	Muguras smadzenes (trīs līmeņos: kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona smadzenes)	[Urīnizvadkanāls]
[Augšstilbs ar locītavu]	[Ožas sīpols]	Liesa	Maksts
Žultspūslis (sugām, kas nav žurka)	Olnīcas	[Krūšu kauls]	Kaulu smadzeņu izgriezumus un/vai svaigus kaulu smadzeņu aspirātus
Hardera dziedzeris			

Pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāsaglabā abi orgāni. Klīnisko un citu konstatējumu rezultātā var rasties vajadzība papildus izmeklēt citus audus. Jāsaglabā arī orgāni, ko, pamatojoties uz zināmām testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, uzskata par iespējamiem mērķorgāniem. Pētījumos ar ārstu aplikāciju ir jāsaglabā tie paši orgāni, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālu ievadišanu, un ir nepieciešams īpašā veidā ņemt un saglabāt ādas paraugus no aplikācijas vietās. Inhalācijas pētījumos saglabāto un izmeklēto elpošanas sistēmas audu sarakstam ir jāatbilst šā pielikuma B.8. nodaļas (8) un B.29. nodaļas (9) ieteikumiem. Kas attiecas uz citiem orgāniem/audiem (un papildus īpašā veidā saglabātajiem elpošanas sistēmas audiem), izmeklē orgānus, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālo ievadišanu.

Histopatoloģija

48. Ir pieejami norādījumi par labāko praksi toksikoloģiskās patoloģijas pētījumu veikšanā (32). Ir jāizdara vismaz šādi histopatoloģiskie izmeklējumi:

- visi audi no lielākās devas grupām un kontrolgrupām,
- visi audi no dzīvniekiem, kas nomiruši vai nonāvēti pētījuma laikā,
- visi audi, kam ir makroskopiskas anomālijas,
- mērķaudi vai audi, kas uzrāda ar ievadišanu saistītas pārmaiņas lielākās devas grupā, no visiem dzīvniekiem visu pārējo devu grupās,
- pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāizmeklē abi orgāni.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

49. Attiecībā uz visiem novērtētajiem parametriem ir jāsniedz dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot dzīvnieku skaitu testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā ir nobeigušies vai humānu apsvērumu dēļ nonāvēti, un katras nobeigšanās vai humānās nonāvēšanas laiku, to dzīvnieku skaitu, kuriem novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju aprakstu, ieskaitot toksiskās ietekmes sākuma laiku, ilgumu un smagumu, to dzīvnieku skaitu, kuriem novēroti audu bojājumi, bojājumu veidus un to dzīvnieku procentuālo īpatsvaru, kuriem parādījušies katra tipa bojājumi. Kopsavilkuma datu tabulās ir jānorāda vidējie lielumi un standartnovirzes (ilgstošu testu datiem) attiecībā uz dzīvniekiem, kam izpaužas toksiska ietekme vai bojājumi, kā arī bojājumi ir jāklasificē.

50. Interpretējot pētījuma rezultātus, var noderēt vēsturiskie kontroldati, piemēram, gadījumā, ja ir norādes, ka dati, kas iegūti paralēlajā kontrolē, būtiski atšķiras no neseniem datiem par kontrolgrupas dzīvniekiem tajā pašā testēšanas kompleksā/kolonijā. Ja izvērtē vēsturiskus datus, tiem jābūt no tās pašas laboratorijas un jāattiecas uz vienāda vecuma un līnijas dzīvniekiem, un jābūt iegūtiem pēdējo piecu gadu laikā pirms attiecīgā pētījuma.
51. Ja vajadzīgs, skaitliskie rezultāti jānovērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistikas metodi. Statistikas metodes un analizējamie dati ir jāizvēlas pētījuma plānošanas posmā (8. punkts). Izvēli izdarot, jāparedz iespēja vajadzības gadījumā to koriģēt attiecībā uz izdzīvošanu.

Testēšanas pārskats

52. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela:

- fizikālās īpašības, tīrība un fizikālķīmiskās īpašības,
- identifikācijas dati,
- ķīmiskās vielas izcelsme,
- sērijas numurs,
- ķīmiskās analīzes sertifikāts.

Nesējviela (attiecīgā gadījumā):

- nesējvielas izvēles pamatojums (ja nesējviela nav ūdens).

Testa dzīvnieki:

- izmantotās sugas/līnija un izvēles pamatojums,
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums testa sākumā,
- izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs utt.,
- katra dzīvnieka svars testa sākumā.

Testēšanas apstākļi:

- ievadišanas ceļa un devu izvēles pamatojums,
- attiecīgā gadījumā statistikas metodes, kas izmantotas datu analizēšanai,
- sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas maisījuma/uztura preparātu,
- analītiski dati par sasniegto preparāta koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,
- testējamās ķīmiskās vielas ievadišanas ceļš un sīka informācija par ievadišanu,
- inhalācijas pētījumiem – vai tika izmantota tikai deguna vai visa ķermeņa ekspozīcija,
- testējamās ķīmiskās vielas faktiskās devas (mg uz kg ķermeņa svara dienā) un attiecīgā gadījumā koeficients, ar kuru testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju (mg/kg vai ppm) barībā / dzeramajā ūdenī pārrēķinātu faktiskajā devā,
- sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti.

Rezultāti (gan kopsavilkuma dati tabulā, gan atsevišķu dzīvnieku dati):

- izdzīvošanas dati,
- ķermeņa svars / ķermeņa svara maiņas,
- barības patēriņš, barības efektivitātes aprēķini, ja tie ir veikti, un attiecīgā gadījumā ūdens patēriņš,
- dati par toksisko atbildes reakciju pēc dzimuma un devu līmeņa, ieskaitot toksicitātes pazīmes,
- klīniski novērotas ietekmes veids, biežums (un, ja notiek klasificēšana, smagums), kā arī ilgums (pārejoša vai pastāvīga),
- oftalmoloģiskā izmeklēšana,
- hematoloģiskie izmeklējumi,
- klīniski bioķīmiskie izmeklējumi,
- urīnanalīzes izmeklējumi,
- jebkādu neirotoksicitātes vai imūntoksicitātes izmeklējumu rezultāti,
- ķermeņa svars pēc nonāvēšanas,
- orgānu svars (un to attiecības, ja vajadzīgs),
- autopsijas atrade,
- visu ar ievadīšanu saistīto histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultātu sīks apraksts,
- dati par absorbciju, ja pieejami.

Rezultātu statistiskā apstrāde pēc vajadzības

Rezultātu interpretācija un komentāri, arī:

- devas un atbildes reakcijas sakarības,
- apsvērumi par informāciju attiecībā uz iedarbības veidu,
- modelēšanas pieeju iztīrājums,
- BMD, NOAEL vai LOAEL noteikšana,
- vēsturiskie kontroldati,
- būtiskums cilvēkam.

Secinājumi

LITERATŪRA

- (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) Šā pielikuma B.27. nodaļa "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav grauzēji".
- (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 N°39, ENV/JM/MONO(2009)28, OECD, Paris.
- (8) Šā pielikuma B.8. nodaļa "Subakūtā inhalācijas toksicitāte: 28 dienu pētījums".
- (9) Šā pielikuma B.29. nodaļa "Subhroniskā inhalācijas toksicitāte: 90 dienu pētījums".
- (10) Šā pielikuma B.9. nodaļa "Atkārtotās devas (28 dienu) toksicitāte (ādas)".
- (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.
- (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) Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīva 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību (OV L 276, 20.10.2010., 33. lpp.).
- (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.
- (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.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJA

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.”;

6) pielikuma B.32. un B.33. nodaļu aizstāj ar šādām:

“B.32. KANCEROGENITĀTES PĒTĪJUMI

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 451 (TG) (2009. gads). Sākotnējos TG 451 par kancerogenitātes pētījumiem pieņēma 1981. gadā. Šīs pārskatītās B.32. testēšanas metodes izstrādi uzskatīja par nepieciešamu, lai atspoguļotu jaunāko attīstību dzīvnieku labturības un regulatīvo prasību jomā (2) (3) (4) (5) (6). Šīs B.32. testēšanas metodes atjaunināšana ir veikta paralēli šā pielikuma B.30. nodaļas “Hroniskās toksicitātes pētījumi” pārskatīšanai un šā pielikuma B.33. nodaļas “Apvienotie hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumi” pārskatīšanai, lai no pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem iegūtu papildu informāciju un sniegtu detalizētāku informāciju par devu izvēli. Šī B.32. testēšanas metode ir izstrādāta, lai to varētu izmantot daudzu dažādu ķīmisko vielu, tostarp pesticīdu un rūpniecisko ķīmisko vielu, testēšanai. Tomēr ir jāatzīmē, ka attiecībā uz farmaceitiskajiem preparātiem daži punkti un prasības var atšķirties (sk. Starptautiskās saskaņošanas konferences (ICH) *Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*).
2. Lielāko daļu kancerogenitātes pētījumu veic ar graužēju sugām, tādēļ šī testēšanas metode ir pirmām kārtām paredzēta pētījumiem ar šīm sugām. Ja šādos pētījumos ir vajadzīgs izmantot sugas, kas nav graužēji, ar attiecīgiem grozījumiem var piemērot arī šajā testēšanas metodē noteiktos principus un procedūras kopā ar principiem un procedūrām, kuras noteiktas šā pielikuma B.27. nodaļā “Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav graužēji” (6). Papildu norādījumi ir sniegti ESAO *Guidance Document No. 116 on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (7).
3. Trīs galvenie ievadīšanas ceļi, ko izmanto kancerogenitātes pētījumos, ir orālais ceļš, ārīga aplikācija un inhalācija. Ievadīšanas ceļu izvēlas atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām, kā arī no tā, kādā ceļā cilvēks galvenokārt nonāk saskarē ar šo vielu. Papildu informācija par ekspozīcijas ceļa izvēli ir sniegta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).
4. Šajā testēšanas metodē galvenā uzmanība tiek pievērsta orālajam ievadīšanas ceļam, kas ir kancerogenitātes pētījumos visbiežāk izmantotā pieeja. Lai gan cilvēku veselības riska novērtēšanai un/vai saskaņā ar konkrētiem tiesiskajiem regulējumiem var būt nepieciešami arī kancerogenitātes pētījumi ar ārīgas aplikācijas vai inhalācijas ekspozīciju, abi minētie ekspozīcijas ceļi tehniski ir diezgan sarežģīti. Šādus pētījumus plāno individuāli, lai gan šeit izklāstītā testēšanas metode testējamo ķīmisko vielu kancerogenitātes novērtēšanai un izvērtēšanai ar orālu ievadīšanu varētu būt pamatā inhalācijas un/vai ārīgas aplikācijas pētījumu protokola ieteikumiem par ievadīšanas periodiem, klīniskajiem un patoloģijas parametriem utt. Ir pieejami ESAO norādījumi par testējamo ķīmisko vielu ievadīšanu ar ārīgu aplikāciju (7) un ar inhalāciju (7) (8). Plānojot ilgtermiņa pētījumus ar inhalācijas ekspozīciju, ir jāizmanto šā pielikuma B.8. nodaļa (9) un B.29. nodaļa (10), kā arī ESAO *Guidance Document on acute inhalation testing* (8). Ja veic testēšanu ar ārīgu aplikāciju, jāizmanto šā pielikuma B.9. nodaļa (11).
5. Kancerogenitātes pētījums nodrošina informāciju par iespējamo veselības apdraudējumu, ko varbūtīgi radīt atkārtotai ekspozīcijai periodā, kurš var ilgt pat visu izmantoto sugu mūžu. Pētījums nodrošinās informāciju par testējamās ķīmiskās vielas toksisko ietekmi, arī par iespējamu kancerogenitāti, kā arī var norādīt mērķorgānus un akumulācijas iespējamību. Pētījumā var iegūt aplēses par līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme attiecībā uz toksisku ietekmi un – negenotoksisku kancerogēnu gadījumā – attiecībā uz audzēju atbildes reakcijām un kuru var izmantot, lai noteiktu cilvēka ekspozīcijas drošuma kritērijus. Ir uzsvērta arī vajadzība izdarīt rūpīgus dzīvnieku klīniskos novērojumus, lai iegūtu iespējami vairāk informācijas.
6. Pēc šīs testēšanas metodes veicamo pētījumu mērķi citu starpā ir šādi:
 - noteikt testējamās ķīmiskās vielas kancerogēnās īpašības, kas salīdzinājumā ar līdztekus uzturētām kontrolgrupām palielina neoplazmu biežumu un ļaundabīgu neoplazmu īpatsvaru vai saīsina laiku, kurā parādās neoplazmas,
 - noteikt kancerogenitātes mērķorgānu vai mērķorgānus,
 - noteikt neoplazmu parādīšanās laiku,

- audzējiem noteikt devas un atbildes reakcijas sakarību,
- noteikt līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme (NOAEL), vai etalondevas (BMD) noteikšanas sākumpunktu,
- kancerogēno ietekmi ekstrapolēt uz cilvēka ekspozīciju zemos devu līmeņos,
- sagādāt datus testa hipotēzēm attiecībā uz iedarbības veidu (2) (7) (12) (13) (14) (15).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

7. Lai pētījuma izstrādi vērstu uz iespējami efektīvāku kancerogenitātes potenciāla testēšanu un lai līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu, novērtējot un izvērtējot testējamās ķīmiskās vielas iespējamo kancerogenitāti, testēšanas laboratorijai pirms pētījuma veikšanas ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu. Īpaši svarīga ir informācija par prognozētā kancerogēna (2) (7) (12) (13) (14) (15) iedarbības veidu un šīs informācijas apsvēršana, jo optimālais plāns var atšķirties atkarībā no tā, vai testējamā ķīmiskā viela ir zināms vai prognozēts genotoksisks kancerogēns. Papildu norādījumi par iedarbības veida apsvērumiem ir pieejami Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).
8. Informācija, kas palīdzēs pētījuma plāna izstrādē, aptver testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes, tostarp genotoksicitātes, testu rezultātus; paredzētos lietošanas veidus un iespējamo cilvēka ekspozīciju; pieejamos (Q)SAR datus, mutagenitāti/genotoksicitāti, kancerogenitāti un citus toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām vielām; pieejamos toksikokinētiskos datus (vienreizējas devas, kā arī atkārtotas devas kinētika, ja šādi dati ir pieejami) un datus, kas iegūti citos atkārtotas ekspozīcijas testos. Kancerogenitātes novērtēšana ir jāveic pēc tam, kad atkārtotas devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos ir iegūta sākotnējā informācija par toksicitāti. Arī īsi vēža izraisīšanas/veicināšanas testi varētu sniegt lietderīgu informāciju. Novērtējot konkrētas testējamās ķīmiskās vielas iespējami nelabvēlīgo ietekmi uz veselību, par šā procesa daļu jāizskata arī kancerogenitātes testēšana ar vairākosmu pieeju (16) (17) (18) (19).
9. Pirms pētījuma sākšanas ir jānosaka rezultātu analizēšanai piemērotākās statistikas metodes, ņemot vērā eksperimenta plānu un mērķus. Ir arī jāapsver, vai statistikas dati nebūtu jākorrigē attiecībā uz izdzīvošanu un vai tajos nebūtu jāietver analīze par kumulatīvajiem audzēju riskiem attiecībā pret izdzīvošanas ilgumu, analīze par to, cik ilgā laikā parādās audzējs, un analīze, ko izmanto gadījumiem, kuros attiecībā uz vienu vai vairākām grupām testu izbeidz priekšlaicīgi. Norādījumi par attiecīgām statistikas analīzēm un galvenās atsaucēs uz starptautiski pieņemtām statistikas metodēm ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7), kā arī *Guidance Document No. 35 on the analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies* (20).
10. Veicot kancerogenitātes pētījumu, vienmēr jāievēro pamatprincipi un apsvērumi, kas sniegti *ESAO Guidance Document No. 19 on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation* (21), it sevišķi šā dokumenta 62. punkts. Šajā punktā ir noteikts, ka: "Pētījumos ar atkārtotām devām, ja dzīvniekam izpaužas klīniskas progresīvas pazīmes, kas noved pie stāvokļa turpmākas pasliktināšanās, ir jāpieņem lēmums par to, vai šāds dzīvnieks ir humāni jānonāvē vai ne. Pieņemot lēmumu, jāapsver tās informācijas vērtība, ko varētu sniegt konkrētā dzīvnieka turpmāka uzturēšana pētījumā, attiecībā pret šā dzīvnieka vispārīgo stāvokli. Ja tiek pieņemts lēmums dzīvnieku paturēt testā, pēc vajadzības novērojumi ir jāveic biežāk. Var arī būt iespējams (negatīvi neietekmējot testa mērķi) uz laiku pārtraukt devas ievadīšanu, ja tas mazinās sāpes vai ciešanas, vai samazināt testa devu."
11. Detalizēti norādījumi un diskusija par devas izvēles principiem hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumiem ir pieejami Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7), kā arī divās *International Life Sciences Institute* publikācijās (22) (23). Devas izvēles pamatstratēģija ir atkarīga no pētījuma galvenā mērķa vai mērķiem (6. punkts). Izvēloties attiecīgus devu līmeņus, ir jāpanāk līdzsvars starp riska novērtēšanu, no vienas puses, un atbildes reakciju uz zemu devu raksturošanu un šo reakciju būtiskumu, no otras puses. Tas ir sevišķi būtiski situācijā, kad ir jāveic apvienotais hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījums (šā pielikuma B.33. nodaļa) (12. punkts).
12. Jāapsver arī iespēja veikt apvienoto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu (šā pielikuma B.33. nodaļa), nevis atsevišķu hroniskās toksicitātes pētījumu (šā pielikuma B.30. nodaļa) un atsevišķu kancerogenitātes pētījumu (ši B.32. testēšanas metode). Salīdzinājumā ar divu atsevišķu pētījumu veikšanu apvienotais tests laika un izmaksu ziņā ir efektīvāks, un ne hroniskajā posmā, ne kancerogenitātes posmā nav pazemināta datu kvalitāte. Tomēr, ja veic apvienoto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu (šā pielikuma B.33. nodaļa), ir rūpīgi jāapsver devu izvēles principi (11. un 22.–25. punkts), un tiek arī atzīts, ka saskaņā ar konkrētiem tiesiskajiem regulējumiem var būt vajadzīgi atsevišķi pētījumi.

13. Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas šīs nodaļas beigās un Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

TESTA PRINCIPS

14. Testējamo ķīmisko vielu ievada pakāpeniskās devās katru dienu vairākām testa dzīvnieku grupām lielāko daļu šo dzīvnieku mūža, parasti to dara orāli. Var būt piemērota arī testēšana ar inhalāciju vai āriņu aplikāciju. Dzīvniekus rūpīgi novēro, vai tiem neparādās toksicitātes pazīmes un neattīstās neoplastiski bojājumi. Dzīvniekiem, kas nobeidzas vai ko nonāvē testa laikā, izdara autopsiju, un testa beigās izdzīvojušos dzīvniekus nonāvē un tiem izdara autopsiju.

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

15. Šī testēšanas metode galvenokārt aptver kancerogenitātes novērtēšanu un izvērtēšanu attiecībā uz grauzējiem (sk. 2. punktu). Var apsvērt tādu sugu izmantošanu, kas nav grauzēji, ja pieejami dati norāda, ka šādas sugas ir piemērotākas, lai prognozētu ietekmi uz cilvēka veselību. Sugu izvēle ir jāpamato. Ieteicamā grauzēju suga ir žurka, bet var izmantot citas grauzēju sugas, piemēram, peles. Lai gan peļu izmantošanai kancerogenitātes testos var būt ierobežota lietderība (24) (25) (26), saskaņā ar dažām spēkā esošām regulatīvajām programmām joprojām ir jāizdara kancerogenitātes testi ar pelēm, ja vien netiek konstatēts, ka šāds pētījums nav zinātniski vajadzīgs. Žurkas un peles ir bijušas ieteicamie eksperimentu modeļi, jo tām ir relatīvi īss mūžs, tās plaši izmanto farmakoloģiskos un toksikoloģiskos pētījumos, tām viegli inducēt audzēju, un tām ir pietiekami daudz līniju ar izpētītām īpašībām. Pateicoties šīm iezīmēm, ir pieejama plaša informācija par šo sugu fizioloģiju un patoloģiju. Papildu informācija par sugu un līnijas izvēli ir sniegta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).
16. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši dzīvnieki, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Kancerogenitātes pētījumu ieteicams veikt ar tās pašas līnijas un izcelsmes dzīvniekiem, kādas izmantotas īsākā(-os) provizoriskā(-os) toksicitātes pētījumā(-os), lai gan, ja ir zināms, ka ar šīs līnijas un izcelsmes dzīvniekiem ir problemātiski sasniegt vispārpieņemtos kritērijus attiecībā uz izdzīvošanu ilgtermiņa pētījumos (sk. Norādījumu dokumentu Nr. 116 (7)), ir jāapsver, vai neizmantojot tādu dzīvnieku līniju, kam ir pieņemams izdzīvošanas rādītājs ilgtermiņa pētījumā. Mācītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas.

Turēšana un barošana

17. Dzīvniekus būros var turēt atsevišķi vai nelielās viendzimuma grupās. Turēšana atsevišķi ir jāapsver tikai tad, ja tas ir zinātniski pamatoti (27) (28) (29). Būrus izvieto tā, lai iespējami mazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Temperatūrai eksperimentālo dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 °C (± 3 °C). Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams, ne vairāk kā 70 %, jācenšas nodrošināt mitrumu 50–60 % robežās. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Uzturam ir jāatbilst visām testā izmantotās sugas uzturvajadzībām, un tādu uztura piesārņotāju, arī pesticīdu atlieku, noturīgu organisko piesārņotāju, fitoestrogēnu, smago metālu un mikotoksīnu, kas varētu ietekmēt testa rezultātu, saturam jābūt iespējami zemākam. Periodiski, vismaz pētījuma sākumā un tad, kad mainās izmantotā sērija, ir jāsaprotavo un galazīpojuma jāietver analītiska informācija par uzturvielu un uztura piesārņojuma līmeņiem. Tāpat ir arī jāsniedz analītiska informācija par pētījumā izmantoto dzeramo ūdeni. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, uztura izvēli var ietekmēt nepieciešamība gan nodrošināt piemērotu testējamās ķīmiskās vielas pieejamumu, gan arī nodrošināt dzīvnieku uzturvajadzības.

Dzīvnieku sagatavošana

18. Ir jāizmanto veseli dzīvnieki, kuri ir aklimatizēti laboratorijas apstākļos vismaz septiņas dienas un ar kuriem iepriekš nav veiktas eksperimentālas procedūras. Grauzēju gadījumā devu došana dzīvniekiem ir jāsāk iespējami drīz tūlīt pēc zīdīšanas un aklimatizācijas, kā arī, vēlams, pirms dzīvnieki sasniedz astoņu nedēļu vecumu. Testa dzīvniekiem norāda sugu, līniju, izcelsmi, dzimumu, svaru un vecumu. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt ± 20 % no visu pētījumā iesaistīto dzīvnieku vidējā svara, kas noteikts katram dzimumam atsevišķi. Dzīvnieki kontroles un testa grupās ir jāiedala nejaušināti. Kad ir veikta nejaušināta izvēle, katru dzimuma grupās vidējais ķermeņa svars nedrīkst būtiski atšķirties. Ja pastāv statistiski būtiskas atšķirības, nejaušināta izvēle ir jāatkārto, ja tas ir iespējams. Katram dzīvniekam jāpiešķir unikāls identifikācijas numurs, kā arī šis dzīvnieks ir noturīgi jāmarķē ar šo numuru, izdarot tetovējumu, implantējot mikročipu vai izmantojot citu piemērotu metodi.

PROCEDŪRA**Dzīvnieku skaits un dzimums**

19. Jāizmanto abi dzimumi. Jāizmanto pietiekams skaits dzīvnieku, lai būtu iespējams veikt rūpīgu bioloģisku un statistisku izvērtēšanu. Tādēļ katras devas grupā un līdztekus uzturētajā kontrolgrupā jābūt vismaz 50 dzīvniekiem no katra dzimuma. Atkarībā no pētījuma mērķa var būt iespējams palielināt galveno aplēšu statistisko nozīmību, nevienmērīgi sadalot dzīvniekus dažādu devu grupās, mazāku devu grupās ietverot vairāk nekā 50 dzīvniekus, piemēram, lai aplēstu kancerogenitātes potenciālu mazu devu gadījumā. Tomēr ir jāapzinās, ka grupas lieluma neliels palielinājums tikai nedaudz palielinās pētījuma statistisko nozīmību. Papildu informācija par tādu pētījuma statistikas plānu un devu līmeņu izvēli, lai iespējami palielinātu statistisko nozīmību, ir sniegta Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

Dzīvnieku nonāvēšana testa laikā, satelītrupas (indikatorgrupas)

20. Lai iegūtu informāciju par neoplastisko pārmaiņu norisi un mehānistisku informāciju, ja tas ir zinātniski pamatoti, pētījumā var paredzēt dzīvnieku nonāvēšanu testa laikā, piemēram, 12. mēnesī. Ja šāda informācija jau ir pieejama no iepriekšējiem atkārtotas devas toksicitātes pētījumiem par testējamo ķīmisko vielu, dzīvnieku nonāvēšana testa laikā var nebūt zinātniski pamatota. Ja pētījuma plāns paredz dzīvnieku nonāvēšanu testa laikā, to dzīvnieku skaits katras devas grupā, ko paredzēts nonāvēt testa laikā, parasti būs 10 dzīvnieki no katra dzimuma, un pētījuma plānā paredzētais dzīvnieku kopskaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kurus līdz pētījuma beigām plānots nonāvēt. Ja vajadzīgs, var izmantot papildu indikatordzīvnieku grupu (parasti pieci dzīvnieki no katra dzimuma), lai pētījuma laikā pārbaudītu slimības stāvokli (30). Papildu norādījumi ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

Devu grupas un dozējums

21. Norādījumi par devu izvēli un intervāliem starp devu līmeņiem visos aspektos ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7). Jāizmanto vismaz trīs devu līmeņi un jānodrošina paralēla kontrole. Devu līmeņus parasti nosaka, pamatojoties uz īsākiem atkārtotas devas vai diapazona noteikšanas pētījumiem un ņemot vērā visus esošos toksikoloģiskos un toksikokinētiskos datus, kas ir pieejami par testējamo ķīmisko vielu vai tai radniecīgajām ķīmiskajām vielām.
22. Ja testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskās īpašības vai bioloģiskā iedarbība to neierobežo, augstākais devas līmenis jāizvēlas ar nolūku noteikt galvenos mērķorgānus un toksisko ietekmi, vienlaikus izvairoties radīt ciešanas, smagu toksicitāti, saslimstību un mirstību. Vienlaikus ņemot vērā turpmāk 23. punktā izklāstītos faktorus, augstākais devas līmenis parasti jāizvēlas tāds, lai tas izraisītu toksicitātes pazīmes, kuras, piemēram, apliecina ķermeņa svara pieauguma samazinājums (apm. 10 %). Tomēr atkarībā no pētījuma mērķiem (sk. 6. punktu) var izvēlēties augstāko devas līmeni, kas ir zemāks par devu, kura nodrošina toksicitātes pazīmes, piemēram, ja deva izraisa būtisku nelabvēlīgu ietekmi, kas tomēr īpaši neietekmē mūža ilgumu vai ķermeņa svaru.
23. Devu līmeņus un intervālus starp devu līmeņiem var izvēlēties tāds, lai varētu noteikt devas un atbildes reakcijas sakarību un – atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas iedarbības veida – NOAEL vai citus paredzamos pētījuma rezultātus, piemēram, BMD (sk. 25. punktu) zemākajā devas līmenī. No faktoriem, kas ir jāapsver, nosakot mazākās devas, minams gaidāmais devas un atbildes reakcijas sakarības līknes slīpums un devas, kuru gadījumā var notikt svarīgas metabolisma vai toksiskās iedarbības veida pārmaiņas, ja ir gaidāms kāds sliekšnis vai ja ir gaidāms sākumpunkts zemu devu ekstrapolācijai.
24. Izraudzītie intervāli starp devu līmeņiem būs atkarīgi no testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, un šajā testēšanas metodes aprakstā tos nevar norādīt, taču lejupejošu devu līmeņu noteikšanā labus testa rezultātus nereti nodrošina divkārtīgi līdz četrkārtīgi intervāli un nereti ir ieteicams pievienot 4. testa grupu, nevis izmantot ļoti lielus intervālus starp dozējumiem (piemēram, pārsniedzot koeficientu 6–10). Parasti jāizvairās no tādu koeficientu izmantošanas, kas pārsniedz 10, un, ja tie tiek izmantoti, tas jāpamato.
25. Kā plašāk aplūkots Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7), izvēloties devas, ir jāņem vērā šādi aspekti:
- devas un atbildes reakcijas sakarības zināmās vai prognozētās nelinearitātes vai liekuma punkti,
 - toksikokinētika un tādu devu diapazoni, kuru gadījumā ir vai nav vērojama metaboliskā inducēšanās, piesātināšanās vai nelinearitāte starp ārēji un iekšēji uzņemtajām devām,
 - jau esoši bojājumi, ietekmes marķieri vai svarīgu, pamatā esošu bioloģisko procesu norises rādītāji,
 - iedarbības veida svarīgākie (vai paredzētie) aspekti, piemēram, devas, kuru gadījumā sākas citotoksicitāte, mainās hormonu līmeņi, tiek nomākti homeostatiskie mehānismi utt.,

- devas un atbildes reakcijas sakarības liknes reģioni, kuros vajadzīgas sevišķi pamatīgas aplēses, piemēram, paredzamās BMD vai prognozētā sliekšņa diapazonā,
- apsvērumi par paredzamiem cilvēka ekspozīcijas līmeņiem.

26. Kontrolgrupa ir vielu nesaņēmusi grupa vai nesējvielas kontroles grupa, ja testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai izmanto nesējvielu. Izņemot testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanu, ar kontrolgrupas dzīvniekiem jārikojas tieši tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem. Ja izmanto nesējvielu, kontrolgrupa saņem lielāko devu grupām izmantoto nesējvielas tilpumu. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu un ja uztura garšas dēļ būtiski samazinās tā patēriņš, par piemērotāku kontrolgrupu var būt lietderīgi izmantot papildu grupu, ko baro tieši tāpat.

Devu sagatavošana un testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana

27. Testējamo ķīmisko vielu parasti ievada orāli ar uzturu vai dzeramo ūdeni vai ar mākslīgo barošanu. Papildu informācija par ievadīšanas ceļiem un metodēm ir sniegta Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7). Ievadīšanas ceļš un metode ir atkarīgi no pētījuma mērķa, testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, tās biopieejamības un cilvēka ekspozīcijas galvenā ceļa un metodes. Izraudzītais ievadīšanas ceļš un metode ir jāpamato. Dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ ievadīt ar mākslīgo barošanu parasti izvēlas tikai tāds preparāts, attiecībā uz kuriem šāds ievadīšanas ceļš un paņēmiens pamatoti raksturo iespējamo cilvēka ekspozīciju (piemēram, farmaceitiskie preparāti). Uzturā vai vidē sastopamas ķīmiskās vielas, arī pesticīdus, parasti ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni. Tomēr dažiem scenārijiem, piemēram, ekspozīcija darbavietā, piemērotāki var būt citi ievadīšanas ceļi.
28. Ja vajadzīgs, testējamo ķīmisko vielu izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējvielā. Pēc vajadzības ir jāņem vērā šādas nesējvielas un citu piedevu īpašības: ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas absorbciju, izplatīšanos, metabolismu vai aizturi; ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas ķīmiskajām īpašībām, kuras var mainīt tās toksiskās īpašības; kā arī ietekme uz barības un ūdens patēriņu vai dzīvnieku barojumu. Ir ieteicams, ja vien iespējams, vispirms apsvērt ūdens šķīduma/suspensijas izmantošanu, pēc tam eļļas (piemēram, kukurūzas eļļas) šķīdumu/emulsiju un pēc tam iespējamu šķīdināšanu citās nesējvielās. Ja nesējviela nav ūdens, ir jāzina šīs nesējvielas toksiskās īpašības. Ir jābūt pieejamai informācijai par to, kā ievadīšanas metode (piemēram, ar uzturu) ietekmē testējamās ķīmiskās vielas stabilitāti un attiecīgi devu šķīduma vai uztura homogenitāti.
29. Ir svarīgi nodrošināt, lai ķīmiskajām vielām, kuras ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni, testējamās ķīmiskās vielas daudzumi neizjauktu parasto uztura vai ūdens līdzsvaru. Ilgtērmiņa toksicitātes pētījumos, kuros veic ievadīšanu ar barību, testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija barībā parasti nedrīkstētu pārsniegt augšējo robežu 5 % apmērā no kopējā uztura, lai nepieļautu uztura nelīdzsvarotību. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, var izmantot vai nu nemainīgu koncentrāciju uzturā (mg uz kg uztura vai ppm), vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru (mg uz kg ķermeņa svara), ko aprēķina reizi nedēļā. Izmantotās alternatīvas ir jānorāda.
30. Orālas ievadīšanas gadījumā graužējiem testējamās ķīmiskās vielas devu ievada katru dienu (septiņas dienas nedēļā), parasti 24 mēnešus (sk. arī 32. punktu). Jebkuram citam devu došanas režīmam, piemēram, piecas dienas nedēļā, jābūt pamatotam. Ārīgas aplikācijas gadījumā dzīvniekus testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai parasti pakļauj vismaz sešas stundas dienā septiņas dienas nedēļā, kā noteikts šā pielikuma B.9. nodaļā (11), un tas ilgst 24 mēnešus. Inhalācijas ekspozīciju veic sešas stundas dienā septiņas dienas nedēļā, bet var izmantot arī ekspozīciju piecu dienas nedēļā, ja tas ir pamatoti. Ekspozīcijas periods parasti būs 24 mēneši. Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti graužēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var koriģēt tā, lai iespējami mazinātu attiecīgajai sugai raksturīgās ciešanas. Ja izmanto ekspozīcijas ilgumus, kas ir mazāki par sešām stundām dienā, tas jāpamato. Sk. arī šā pielikuma B.8. nodaļu (9).
31. Ja testējamo ķīmisko vielu dzīvniekiem ievada ar mākslīgo barošanu, tas jā dara ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli vienos un tajos pašos laikos katru dienu. Parasti reizi dienā ievada vienreizēju devu; ja, piemēram, ķīmiskā viela ir lokāls kairinātājs, ikdienas devu var nodrošināt, to ievadot kā dalītu devu (divreiz dienā). Maksimālais šķidrums tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testējamā dzīvnieka lieluma. Tilpumam jābūt iespējami mazākam, un graužējiem tas parasti nedrīkstētu pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara (31). Testa tilpuma mainība ir jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos tilpums būtu vienāds. Izņēmums ir iespējami kairinošas vai kodīgas ķīmiskās vielas, kas ir jāatšķaida, lai izvairītos no smagas lokālas iedarbības. Ir jāizvairās no tādu koncentrāciju testēšanas, kas, visticamāk, būs kodīgas vai kairinošas kuņģa un zarnu traktam.

Pētījuma ilgums

32. Pētījums ar graužējiem parasti ilgst 24 mēnešus – lielāko daļu no izmantojamo dzīvnieku mūža. Atkarībā no pētījumā izmantoto dzīvnieku sugu līnijas mūža ilguma pētījuma ilgums var būt lielāks vai mazāks, bet tas ir jāpamato. Konkrētām peļu līnijām, piemēram, līnijām AKR/J, C3H/J vai C57BL/6J, piemērotāki varētu būt 18 mēneši. Turpmāk ir doti daži norādījumi par ilgumu, pētījuma izbeigšanu un izdzīvošanu; papildu norādījumi, tostarp apsvērumi par to, kad attiecībā uz izdzīvošanu pētījumā pieņemt, ka kancerogenitātes pētījums ir negatīvs, ir sniegti ESAO *Guidance Document No. 116 on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (7).

- Pētījuma izbeigšana ir jāapsver gadījumā, ja izdzīvojušo dzīvnieku skaits zemāko devu grupās vai kontrolgrupā ir zem 25 %.
- Tādā gadījumā, ja toksicitātes dēļ priekšlaicīgi nobeidzas tikai augstākās devas grupa, pētījumu nevajadzētu izbeigt.
- Katra dzimuma izdzīvošana ir jāaplūko atsevišķi.
- Ja no pētījuma pieejamie dati vairs nav pietiekami statistiski derīgi izvērtēšanai, pētījumu nevajadzētu turpināt.

NOVĒROJUMI

33. Visi dzīvnieki ir jāpārbauda, lai konstatētu saslimstību vai mirstību, parasti katras dienas sākumā un beigās, arī nedēļas nogalēs un brīvdienās. Reizi dienā turklāt jāpārbauda, vai dzīvniekiem nav parādījušās konkrētas toksikoloģiski būtiskas pazīmes, ņemot vērā paredzamās ietekmes maksimuma laiku pēc devas ievadīšanas, ja ir izmantota maksimālā barošana. Īpaši uzmanīgi jāseko audzēju attīstībai, reģistrējot katra skaidri saskatāma vai sataustāma audzēja parādīšanās brīdi, atrašanās vietu, izmērus, izskatu un turpmāko attīstību.

Ķermeņa svars, barības/ūdens patēriņš un barības efektivitāte

34. Visi dzīvnieki jānosver vielas ievadīšanas sākumā, pēc tam vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī turpmāk. Barības patēriņa un barības efektivitātes mērījumi ir jāizdara vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam. Ūdens patēriņš ir jāmēra vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam, ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar dzeramo ūdeni. Jāapsver, vai ūdens patēriņa mērījumus neizdarīt arī pētījumos ar mainītu dzeršanas aktivitāti.

Hematoloģija, klīniskā bioķīmija un citi mērījumi

35. Lai no pētījuma iegūtu iespējami vairāk informācijas, it sevišķi attiecībā uz iedarbības veida apsvērumiem, var ņemt asins paraugus hematoloģiskajiem un klīniskā bioķīmiskajiem izmeklējumiem. Lēmumu par to pieņem pētījuma vadītājs. Piemērotas var būt arī urīnānālizē. Papildu norādījumi par šādu paraugu ņemšanas vērtību kancerogenitātes pētījuma ietvaros ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7). Ja uzskata, ka tas piemēroti, asins paraugus hematoloģiskiem un klīniskās ķīmijas izmeklējumiem var ņemt, veicot nonāvēšanu testa laikā (20. punkts) un pētījuma beigās tās ņemot vismaz 10 dzīvniekiem no katra dzimuma katrā grupā. Asins paraugi ir jāņem no precīzi norādītās vietas, piemēram, ar sirds punktēšanu vai no retroorbitālā sinusa, dzīvnieku anestezējot, un vajadzības gadījumā jāglabā piemērotos apstākļos. Izmeklēšanai var sagatavot arī asins uztriepes, it sevišķi, ja ir konstatējams, ka kaula smadzenes ir mērķorgāns, lai gan šāda izmeklēšana vērtība kancerogēnā/onkogēnā potenciāla novērtēšanā ir tikusi apšaubīta (32).

PATOLOĢIJA

Pilna autopsija

36. Visiem pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem, izņemot indikatordzīvniekus (sk. 20. punktu) un citus satelītgrupas dzīvniekus, jāveic pilna, detalizēta autopsija, ieskaitot ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa dobumu, torakālā dobuma, vēdera dobuma, kā arī šo dobumu satura rūpīgu apskati. Indikatordzīvniekiem un citiem satelītgrupas dzīvniekiem var būt vajadzīga autopsija (vajadzību izskata katrā gadījumā atsevišķi, un lēmumu pieņem pētījuma vadītājs). Orgānu svara noteikšana parasti neietilpst kancerogenitātes pētījumā, jo geriatriskas pārmaiņas un – vēlākā posmā – audzēju attīstība mazina orgānu svara datu lietderību. Tomēr orgānu svaru noteikt var būt ļoti svarīgi apliecinājuma nozīmes izvērtēšanā un pēc tā it sevišķi var spriest par iedarbības veidu. Ja orgānu svara noteikšana ietilpst satelītpētījumā, dati jāievāc ne vēlāk kā vienu gadu pēc pētījuma sākšanas.
37. Fiksācijas šķīdumā, kas ir vispiemērotākais gan konkrētā veida audu izmeklēšanai, gan paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai (33), ir jākonservē turpmāk sarakstā norādītie audi (kvadrātikavās dotie audi nav obligāti).

Visi makroskopiskie bojājumi	Sirds	Aizkuņģa dziedzeris	Kuņģis (priekškuņģis, dziedzeris)
Virsnieru dziedzeris	Līkumainā zarna	Epitēlijķermenīši	[Zobi]
Aorta	Tukšā zarna	Perifērais nervs	Sēklinieki
Smadzenes (tostarp galveno smadzeņu, smadzeņu un iegareno smadzeņu / smadzeņu tilta izgriezumā)	Nieres	Hipofīze	Tīms
Aklā zarna	Asaru dziedzeri (ārpusorbitālas)	Prostata	Vairogdziedzeris
Dzemes kakls	Aknas	Taisnā zarna	[Mēle]
Koagulācijas dziedzeris	Plaušas	Siekalu dziedzeris	Traheja
Lokzarna	Limfmezgli (gan virspusējie, gan dziļie)	Sēklas pūslīši	Urīnpūslis
Divpadsmitpirkstu zarna	Piena dziedzeris (obligāti mātītēm un, ja iespējams secēt, tēviņiem arī)	Skeleta muskuļu paraugs	Dzemde un dzemes kakls
Sēklinieku piedēkļi	[Augšējās elpošanas sistēmas orgāni, tostarp deguns, deguna gliemežnīca un paranasālais sinuss]	Āda	[Urīnvads]
Acs (arī tīklene)	Barības vads	Muguras smadzenes (trīs līmeņos: kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona smadzenes)	[Urīnizvadkanāls]
[Augšstilbs ar locītavu]	[Ožas sīpols]	Liesa	Maksts
Žultspūslis (sugām, kas nav žurka)	Olnīcas	[Krūšu kauls]	Kaulu smadzeņu izgriezumā un/vai svaigs kaulu smadzeņu aspirāts
Hardera dziedzeris			

Pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāsaņem abi orgāni. Klīnisko un citu konstatējumu rezultātā var rasties vajadzība papildus izmeklēt citus audus. Jāsaņem arī orgāni, ko, pamatojoties uz zināmām testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, uzskata par iespējamiem mērķorgāniem. Pētījumos ar ātrīgu aplikāciju ir jāsaņem tie paši orgāni, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālu ievadīšanu, un ir nepieciešams īpašā veidā ņemt un saņemt ādas paraugus no aplikācijas vietas. Inhalācijas pētījumos saņemto un izmeklēto elpošanas sistēmas audu sarakstam ir jāatbilst šā pielikuma B.8. un B.29. nodaļas noteikumiem. Kas attiecas uz citiem orgāniem/audiem (un papildus īpašā veidā saņemtajiem elpošanas sistēmas audiem), izmeklē orgānus, kas ietverti orālās ievadīšanas orgānu sarakstā.

Histopatoloģija

38. Ir pieejami norādījumi par labāko praksi toksikoloģiskās patoloģijas pētījumu veikšanā (33). Ir jāizmeklē vismaz šādi audi:

- visi audi no lielākās devas grupām un kontrolgrupām,
- visi audi no dzīvniekiem, kas nomiruši vai nonāvēti pētījuma laikā,
- visi audi, kam ir makroskopiskas anomālijas, tostarp audzēji,
- ja lielākās devas grupā ir novērotas ar vielas saņemšanu saistītas histopatoloģiskās pārmaiņas, tie paši audi ir jāizmeklē visu pārējo devu grupu dzīvniekiem,
- pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāizmeklē abi orgāni.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

39. Attiecībā uz visiem novērtētajiem parametriem ir jāsniedz dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot dzīvnieku skaitu testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā ir nobeigušies vai humānu apsvērumu dēļ nonāvēti, un katras nobeigšanās vai humānās nonāvēšanas laiku, to dzīvnieku skaitu, kuriem novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju aprakstu, ieskaitot toksiskās ietekmes sākuma laiku, ilgumu un smagumu, to dzīvnieku skaitu, kuriem novēroti audu bojājumi, bojājumu veidus, un to dzīvnieku procentuālo īpatsvaru, kuriem parādījušies katra tipa bojājumi. Kopsavilkuma datu tabulās ir jānorāda vidējie lielumi un standartnovirzes (ilgstošu testu datiem) attiecībā uz dzīvniekiem, kam izpaužas toksiska ietekme vai bojājumi, kā arī bojājumi ir jāklasificē.
40. Interpretējot pētījuma rezultātus, var noderēt vēsturiskie kontroldati, piemēram, gadījumā, ja ir norādes, ka dati, kas iegūti paralēlajā kontrolē, būtiski atšķiras no neseniem datiem par kontrolgrupas dzīvniekiem tajā pašā testēšanas kompleksā/kolonijā. Ja izvērtē vēsturiskus datus, tiem jābūt no tās pašas laboratorijas un jāattiecas uz vienāda vecuma un līnijas dzīvniekiem, un jābūt iegūtiem pēdējo piecu gadu laikā pirms attiecīgā pētījuma.
41. Ja vajadzīgs, skaitliskie rezultāti jānovērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistikas metodi. Statistikas metodes un analizējamie dati ir jāizvēlas pētījuma plānošanas posmā (9. punkts). Izvēli izdarot, jāparedz iespēja vajadzības gadījumā to koriģēt attiecībā uz izdzīvošanu.

Testēšanas pārskats

42. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija.

Testējamā ķīmiskā viela:

- fizikālās īpašības, tīrība un fizikālķīmiskās īpašības,
- identifikācijas dati,
- ķīmiskās vielas izcelsme,
- sērijas numurs,
- ķīmiskās analīzes sertifikāts.

Nesējviela (attiecīgā gadījumā):

- nesējvielas izvēles pamatojums (ja nesējviela nav ūdens).

Testa dzīvnieki:

- izmantotās sugas/līnija un izvēles pamatojums,
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums testa sākumā,
- izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs utt.,
- katra dzīvnieka svars testa sākumā.

Testēšanas apstākļi:

- ievadīšanas ceļa un devu izvēles pamatojums,
- attiecīgā gadījumā statistikas metodes, kas izmantotas datu analizēšanai,
- sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas maisījuma / uztura preparātu,
- analītiski dati par sasniegto preparāta koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,

- testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas ceļš un sīka informācija par ievadīšanu,
- inhalācijas pētījumiem – vai tika izmantota tikai deguna vai visa ķermeņa ekspozīcija,
- testējamās ķīmiskās vielas faktiskās devas (mg uz kg ķermeņa svara dienā) un attiecīgā gadījumā koeficients, ar kuru testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju (mg/kg vai ppm) barībā / dzeramajā ūdenī pārrēķinātu faktiskajā devā,
- sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti.

Rezultāti (gan kopsavilkuma dati tabulā, gan atsevišķu dzīvnieku dati)

Vispārīgi:

- izdzīvošanas dati,
- ķermeņa svars / ķermeņa svara maiņas,
- barības patēriņš, barības efektivitātes aprēķini, ja tie ir veikti, un attiecīgā gadījumā ūdens patēriņš,
- toksikokinētiskie dati, ja pieejami,
- oftalmoskopija (ja pieejama),
- hematoloģija (ja pieejama),
- klīniskā ķīmija (ja pieejama).

Klīniskie konstatējumi:

- toksicitātes pazīmes,
- visu anomāliju biežums (un, ja notiek klasificēšana, smagums),
- klīniski novērotas ietekmes veids, smagums un ilgums (pārejoša vai pastāvīga).

Autopsijas dati:

- ķermeņa svars pēc nonāvēšanas,
- orgānu svars un to attiecības, ja vajadzīgs,
- autopsijas atrade; anomāliju biežums un smagums.

Histopatoloģija:

- histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultāti, kas nav saistīti ar neoplastiku,
- neoplastikas histopatoloģiskā atrade,
- korelācijas starp makroskopisku un mikroskopisku atradi,
- visu ar ievadīšanu saistīto histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultātu sīks apraksts, kurā ietverta arī smaguma klasifikācija,

— ziņojums par priekšmetstikliņu salīdzinošo izvērtēšanu.

Rezultātu statistiskā apstrāde pēc vajadzības

Komentāri par rezultātiem, arī:

- modelēšanas pieeju iztīrījums,
- devas un atbildes reakcijas sakarības,
- vēsturiskie kontroldati,
- apsvērumi par informāciju attiecībā uz iedarbības veidu,
- BMD, NOAEL vai LOAEL noteikšana,
- būtiskums cilvēkam.

Secinājumi

LITERATŪRA

- (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) Šā pielikuma B.27. nodaļa "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav grauzēji".
- (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) Šā pielikuma B.8. nodaļa "Subakūtā inhalācijas toksicitāte: 28 dienu pētījums".
- (10) Šā pielikuma B.29. nodaļa "Subhroniskā inhalācijas toksicitāte: 90 dienu pētījums".
- (11) Šā pielikuma B.9. nodaļa "Atkārtotās devas (28 dienu) toksicitāte (ādas)".
- (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.
- (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) Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīva 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību (OV L 276, 20.10.2010., 33. lpp.).
- (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.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJA

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

B.33. APVIENOTIE HRONISKĀS TOKSICITĀTES UN KANCEROGENITĀTES PĒTĪJUMI

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 453 (TG) (2009. gads). Sākotnējos TG 453 pieņēma 1981. gadā. Šis atjauninātās B.33. testēšanas metodes izstrādi uzskatīja par nepieciešamu, lai atspoguļotu jaunāko attīstību dzīvnieku labturības un regulatīvo prasību jomā (1) (2) (3) (4) (5). Šīs B.33. testēšanas metodes atjaunināšana ir veikta paralēli šā pielikuma B.32. nodaļas "Kancerogenitātes pētījumi" pārskatīšanai un šā pielikuma B.30. nodaļas "Hroniskās toksicitātes pētījumi" pārskatīšanai, lai no pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem iegūtu papildu informāciju un sniegtu detalizētāku informāciju par devu izvēli. Šī testēšanas metode ir izstrādāta, lai to varētu izmantot daudzu dažādu ķīmisko vielu, tostarp pesticīdu un rūpniecisko ķīmisko vielu, testēšanai. Tomēr ir jāatzīmē, ka attiecībā uz farmaceitiskajiem preparātiem daži punkti un prasības var atšķirties (sk. Starptautiskās saskaņošanas konferences (ICH) *Guidance S1B on Testing for Carcinogenicity of Pharmaceuticals*).
2. Lielāko daļu hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu veic ar graužēju sugām, tādēļ šī testēšanas metode ir pirmām kārtām paredzēta pētījumiem ar šīm sugām. Ja šādos pētījumos ir vajadzīgs izmantot sugas, kas nav graužēji, ar attiecīgiem grozījumiem var piemērot arī šeit noteiktos principus un procedūras kopā ar principiem un procedūrām, kuras noteiktas šā pielikuma B.27. nodaļā "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav graužēji" (6), kā noteikts ESAO *Guidance Document No. 116 on the Design and Conduct of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies* (7).
3. Trīs galvenie ievadīšanas ceļi, ko izmanto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumos, ir orālais ceļš, ārīga aplikācija un inhalācija. Ievadīšanas ceļu izvēlas atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām, kā arī no tā, kādā ceļā cilvēks galvenokārt nonāk saskarē ar šo vielu. Papildu informācija par ekspozīcijas ceļa izvēli ir sniegta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).
4. Šajā testēšanas metodē galvenā uzmanība tiek pievērsta orālajam ievadīšanas ceļam, kas ir hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumos visbiežāk izmantotā pieeja. Lai gan cilvēka veselības riska novērtēšanai un/vai saskaņā ar konkrētiem tiesiskajiem regulējumiem var būt nepieciešami arī ilgtermiņa pētījumi ar ārīgas aplikācijas vai inhalācijas ekspozīciju, abi minētie ekspozīcijas ceļi tehniski ir diezgan sarežģīti. Šādi pētījumi būs jāplāno katrā gadījumā atsevišķi, lai gan šeit izklāstītā testēšanas metode ķīmisko vielu hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes novērtēšanai un izvērtēšanai ar orālu ievadīšanu varētu būt pamatā inhalācijas un/vai ārīgas aplikācijas pētījumu protokola ieteikumiem par ievadīšanas periodiem, klīniskajiem un patoloģijas parametriem utt. Ir pieejami ESAO norādījumi par testējamo ķīmisko vielu ievadīšanu ar inhalāciju (7) (8) un ar ārīgu aplikāciju (7). Plānojot ilgtermiņa pētījumus ar inhalācijas ekspozīciju, ir jāizmanto šā pielikuma B.8. nodaļa (9) un B.29. nodaļa (10), kā arī ESAO *Guidance Document on acute inhalation testing* (8). Ja veic testēšanu ar ārīgu aplikāciju, jāizmanto šā pielikuma B.9. nodaļa (11).
5. Apvienotais hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījums nodrošina informāciju par iespējamo veselības apdraudējumu, ko var radīt atkārtota ekspozīcija periodā, kurš var ilgt pat visu izmantoto sugu mūžu. Pētījums nodrošinās informāciju par testējamās ķīmiskās vielas toksisko ietekmi, arī par iespējamu kancerogenitāti, kā arī norādīs mērķorgānus un akumulācijas iespējamību. Pētījumā var iegūt aplēses par līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme attiecībā uz toksisku iedarbību un – negenotoksisku kancerogēnu gadījumā – attiecībā uz audzēju atbildes reakcijām un kuru var izmantot, lai noteiktu cilvēka ekspozīcijas drošuma kritērijus. Ir uzsvērts arī vajadzība izdarīt rūpīgus dzīvnieku klīniskos novērojumus, lai iegūtu iespējami vairāk informācijas.
6. Pēc šīs testēšanas metodes veicamo hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu mērķi citu starpā ir šādi:
 - Noteikt testējamās ķīmiskās vielas kancerogēnās īpašības, kas salīdzinājumā ar līdztekus uzturētām kontrolgrupām palielina neoplazmu biežumu un ļaundabīgu neoplazmu īpatsvaru vai samazina laiku, kurā parādās neoplazmas,
 - noteikt neoplazmu parādīšanās laiku,
 - noteikt testējamās ķīmiskās vielas hronisko toksicitāti,

- noteikt hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes mērķorgānus,
- noteikt devas un atbildes reakcijas sakarību,
- noteikt līmeni, kurā nav novērojama nelabvēlīga ietekme (NOAEL), vai etalondevas (BMD) noteikšanas sākumpunktu,
- kancerogēno ietekmi ekstrapolēt uz cilvēka ekspozīciju zemos devu līmeņos,
- prognozēt hroniskās toksicitātes ietekmi līmeņos, kādos paredzama cilvēka ekspozīcija,
- sagādāt datus testa hipotēzēm attiecībā uz iedarbības veidu (2) (7) (12) (13) (14) (15).

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

7. Lai pētījuma izstrādi vērstu uz toksikoloģisko īpašību iespējami efektīvāku testēšanu un lai tajā līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu, novērtējot un izvērtējot testējamās ķīmiskās vielas iespējamo kancerogenitāti un hronisko toksicitāti, testēšanas laboratorijai, pirms tā veic pētījumu, ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu. Īpaši svarīga ir informācija par prognozētā kancerogēna (2) (7) (12) (13) (14) (15) iedarbības veidu un šīs informācijas apsvēršana, jo optimālais plāns var atšķirties atkarībā no tā, vai testējamā ķīmiskā viela ir zināms vai prognozēts genotoksisks kancerogēns. Papildu norādījumi par iedarbības veida apsvērumiem ir pieejami Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).
8. Informācija, kas palīdzēs pētījuma plāna izstrādē, aptver testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu informāciju par iedarbības veidu; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes, tostarp genotoksicitātes, testu rezultātus; paredzētos lietošanas veidus un iespējamo cilvēka ekspozīciju; pieejamos (Q)SAR datus, mutagenitāti/genotoksicitāti, kancerogenitāti un citus toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām vielām; pieejamos toksikokinētiskos datus (vienreizējas devas, kā arī atkārtotas devas kinētika, ja šādi dati ir pieejami) un datus, kas iegūti citos atkārtotas ekspozīcijas testos. Hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes noteikšana ir jāveic tikai pēc tam, kad atkārtotas devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos iegūta sākotnējā informācija par toksicitāti. Arī īsi vēža izraisīšanas/veicināšanas testi varētu sniegt lietderīgu informāciju. Novērtējot konkrētas testējamās ķīmiskās vielas iespējami nelabvēlīgo ietekmi uz veselību, par šā procesa daļu jāizskata arī kancerogenitātes testēšana ar vairākpasmi pieeju (16) (17) (18) (19).
9. Pirms pētījuma sākšanas ir jānosaka rezultātu analizēšanai piemērotākās statistikas metodes, ņemot vērā eksperimenta plānu un mērķus. Ir arī jāapsver, vai statistikas dati nebūtu jākorrigē attiecībā uz izdzīvošanu un vai tajos nebūtu jāietver analīze par kumulatīvajiem audzēju riskiem attiecībā pret izdzīvošanas ilgumu, analīze par to, cik ilgā laikā parādās audzējs, un analīze, ko izmanto gadījumiem, kuros attiecībā uz vienu vai vairākām grupām testu izbeidz priekšlaicīgi. Norādījumi par attiecīgām statistikas analizēm un galvenās atsaucis uz starptautiski pieņemtām statistikas metodēm ir sniegtas *Guidance Document No. 116 (7)*, kā arī *Guidance Document No. 35 on the analysis and evaluation of chronic toxicity and carcinogenicity studies (20)*.
10. Veicot kancerogenitātes pētījumu, vienmēr jāievēro pamatprincipi un apsvērumi, kas sniegti *ESAO Guidance Document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation (21)*, it sevišķi šā dokumenta 62. punkts. Šajā punktā ir noteikts, ka: "Pētījumos ar atkārtotām devām, ja dzīvniekam izpaužas klīniskas progresīvas pazīmes, kas noved pie stāvokļa turpmākas pasliktināšanās, ir jāpieņem informēts lēmums par to, vai šāds dzīvnieks ir humāni jānonāvē vai ne. Pieņemot lēmumu, jāapsver tās informācijas vērtība, ko varētu sniegt konkrētā dzīvnieka turpmāka uzturēšana pētījumā, attiecībā pret šā dzīvnieka vispārīgo stāvokli. Ja tiek pieņemts lēmums dzīvnieku paturēt testā, pēc vajadzības novērojumi ir jāveic biežāk. Var arī būt iespējams (negatīvi neietekmējot testa mērķi) uz laiku pārtraukt devas ievadīšanu, ja tas mazinās sāpes vai ciešanas, vai samazināt testa devu."
11. Detalizēti norādījumi un diskusija par devas izvēles principiem hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumiem ir pieejami Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7), kā arī divās *International Life Sciences Institute* publikācijās (22) (23). Devas izvēles pamatstratēģija ir atkarīga no pētījuma galvenā mērķa vai mērķiem (6. punkts). Izvēloties attiecīgus devu līmeņus, ir jāpanāk līdzsvars starp riska novērtēšanu, no vienas puses, un atbildes reakciju uz zemu devu raksturošanu un šo reakciju būtiskumu, no otras puses. Tas ir sevišķi būtiski attiecībā uz šo apvienoto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu.

12. Jāapsver arī iespēja veikt šo apvienoto hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu, nevis atsevišķu hroniskās toksicitātes pētījumu (šā pielikuma B.30. nodaļa) un atsevišķu kancerogenitātes pētījumu (šā pielikuma B.32. nodaļa). Salīdzinājumā ar divu atsevišķu pētījumu veikšanu apvienotais tests laika un izmaksu ziņā ir efektīvāks, tajā izmanto mazāk dzīvnieku un ne hroniskajā posmā, ne kancerogenitātes posmā nav pazemināta datu kvalitāte. Tomēr, ja veic apvienoto toksicitātes un kancerogenitātes pētījumu, ir rūpīgi jāapsver devu izvēles principi (11. un 22.–26. punkts), un tiek arī atzīts, ka saskaņā ar konkrētiem tiesiskajiem regulējumiem var būt vajadzīgi atsevišķi pētījumi. Papildu norādījumi par apvienotā hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījuma plānu, kas nodrošinātu iespējami lielāku pētījuma efektivitāti tādā aspektā kā iespēja samazināt izmantoto dzīvnieku skaitu, kā arī racionalizējot dažādās eksperimentu procedūras, ir pieejami Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).
13. Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas šīs nodaļas beigās un Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

TESTA PRINCIPS

14. Pētījuma plānam ir divi paralēli posmi – hroniskais posms un kancerogenitātes posms (ilgums norādīts attiecīgi 34. un 35. punktā). Testējamo ķīmisko vielu parasti ievada orāli, lai gan var būt piemērota arī testēšana ar inhalāciju vai ārgu aplikāciju. Hroniskajā posmā testējamo ķīmisko vielu ievada pakāpeniskās devās katru dienu vairākām testa dzīvnieku grupām, vienu devas līmeni katrai grupai, parasti 12 mēnešus, lai gan var izraudzīties arī garākus vai īsākus periodus atkarībā no regulatīvajām prasībām (sk. 34. punktu). Izvēlas periodu, kas ir pietiekami ilgs, lai jebkāda kumulatīvas toksicitātes ietekme kļūtu pamanāma bez geriatrisku pārmaiņu maldinošajām sekām. Pētījuma plāns var ietvert arī vienu vai vairākas dzīvnieku nonāvēšanas testa laikā, piemēram, trešajā un sestajā mēnesī, un var tikt ietvertas papildu dzīvnieku grupas, lai šim apstāklim pielāgotos (sk. 20. punktu). Kancerogenitātes posmā testējamo ķīmisko vielu ievada katru dienu vairākām testa dzīvnieku grupām, un ekspozīcijas laiks aptver ievērojamu to mūža daļu. Abos posmos dzīvniekus rūpīgi novēro, vai tiem neparedzams toksicitātes pazīmes un neattīstās neoplastiski bojājumi. Dzīvniekiem, kas nobeidzas vai ko nonāvē testa laikā, izdara autopsiju, un testa beigās izdzīvojušos dzīvniekus nonāvē un tiem izdara autopsiju.

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

15. Šī testēšanas metode galvenokārt attiecas uz hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes novērtēšanu un izvērtēšanu attiecībā uz grauzējiem (sk. 2. punktu). Var apsvērt tādu sugu izmantošanu, kas nav grauzēji, ja pieejami dati norāda, ka šādas sugas ir piemērotākas, lai prognozētu ietekmi uz cilvēka veselību. Sugu izvēle ir jāpamato. Ieteicamā grauzēju suga ir žurka, bet var izmantot citas grauzēju sugas, piemēram, peles. Lai gan pelu izmantošanai kancerogenitātes testos var būt ierobežota lietderība (24) (25) (26), saskaņā ar dažām spēkā esošām regulatīvajām programmām joprojām ir jāizdara kancerogenitātes testi ar pelēm, ja vien netiek konstatēts, ka šāds pētījums nav zinātniski vajadzīgs. Žurkas un peles ir bijušas ieteicamie eksperimentu modeļi, jo tām ir relatīvi īss mūžs, tās plaši izmanto farmakoloģiskos un toksikoloģiskos pētījumos, tām viegli inducēt audzēju, un tām ir pietiekami daudz līniju ar izpētītām īpašībām. Pateicoties šīm iezīmēm, ir pieejama plaša informācija par šo sugu fizioloģiju un patoloģiju. Ja jāveic hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījumi ar sugām, kas nav grauzēji, šie pētījumi jāplāno un jāīsteno, balstoties uz principiem, kuri izklāstīti šajā testēšanas metodē, kā arī šā pielikuma B.27. nodaļā "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav grauzēji" (6). Papildu informācija par sugu un līnijas izvēli ir sniegta ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).
16. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši dzīvnieki, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Apvienotais hroniskās toksicitātes un kancerogenitātes pētījums ir jāveic ar tās pašas līnijas un izcelsmes dzīvniekiem, kādas izmantotas īsākā(-os) provizoriskā(-os) toksicitātes pētījumā(-os), lai gan, ja ir zināms, ka ar šīs līnijas un izcelsmes dzīvniekiem ir problemātiski sasniegt vispārpieņemtos kritērijus attiecībā uz izdzīvošanu ilgtermiņa pētījumos (sk. Norādījumu dokumentu Nr. 116 (7)), ir jāapsver, vai neizmantojot tādu dzīvnieku līniju, kam ir pieņemams izdzīvošanas rādītājs ilgtermiņa pētījumā. Mācītes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas.

Turēšanas un barošanas apstākļi

17. Dzīvniekus būros var turēt atsevišķi vai nelielās viendzimuma grupās. Turēšana atsevišķi ir jāapsver tikai tad, ja tas ir zinātniski pamatoti (27) (28) (29). Būrus izvieto tā, lai iespējami mazinātu būru novietojuma varbūtējo ietekmi. Temperatūrai eksperimenta dzīvnieku turēšanas telpā jābūt 22 °C (± 3 °C). Lai gan relatīvajam mitrumam jābūt vismaz 30 % un, izņemot telpu uzkopšanas laiku, vēlams, ne vairāk kā 70 %, jācenšas nodrošināt mitrumu 50–60 % robežās. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumšā. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim. Uzturam ir jāatbilst visām testā izmantotās sugas uzturvajadzībām, un uztura piesārņotāju, arī pesticīdu atlieku, noturīgu organisko piesārņotāju, fitoestrogēnu, smago metālu un mikotoksīnu, kas varētu ietekmēt testa rezultātu, saturam jābūt iespējami zemākam. Periodiski, vismaz pētījuma sākumā un tad, kad mainās izmantotā sērija, ir jāsapatavo un galareziojumā jāietver analītiska informācija par uzturvietu un uztura piesārņojuma līmeņiem.

Tāpat ir arī jāsniedz analītiska informācija par pētījumā izmantoto dzeramo ūdeni. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, uztura izvēli var ietekmēt nepieciešamība gan nodrošināt piemērotu testējamās ķīmiskās vielas pieejamību, gan arī nodrošināt dzīvnieku uzturvajadzības.

Dzīvnieku sagatavošana

18. Ir jāizmanto veseli dzīvnieki, kuri ir aklimatizēti laboratorijas apstākļos vismaz septiņas dienas un ar kuriem iepriekš nav veiktas eksperimentālas procedūras. Grauzēju gadījumā devu došana dzīvniekiem ir jāsāk iespējami drīz tūlīt pēc zīdīšanas un aklimatizācijas, kā arī, vēlams, pirms dzīvnieki sasniedz astoņu nedēļu vecumu. Testa dzīvniekiem norāda sugu, līniju, izcelsmi, dzimumu, svaru un vecumu. Pētījuma sākumā dzīvnieku svara atšķirībām jābūt minimālām un tās nedrīkst pārsniegt $\pm 20\%$ no visu pētījumā iesaistīto dzīvnieku vidējā svara, kas noteikts katram dzimumam atsevišķi. Dzīvnieki kontroles un testa grupās ir jāiedala nejaušināti. Kad ir veikta nejaušināta izvēle, katra dzimuma grupās vidējais ķermeņa svars nedrīkst būtiski atšķirties. Ja pastāv statistiski būtiskas atšķirības, nejaušināta izvēle ir jāatkārto, ja tas ir iespējams. Katram dzīvniekam jāpiešķir unikāls identifikācijas numurs, kā arī šis dzīvnieks ir noturīgi jāmarķē ar šo numuru, izdarot tetovējumu, implantējot mikročipu vai izmantojot citu piemērotu metodi.

PROCEDŪRA

Dzīvnieku skaits un dzimums

19. Jāizmanto abi dzimumi. Jāizmanto pietiekams skaits dzīvnieku, lai būtu iespējams veikt rūpīgu bioloģisku un statistisku izvērtēšanu. Grauzējiem katrā devas grupā, kas paredzēta pētījuma kancerogenitātes posmam (kā izklāstīts 22. punktā), un līdztekus uzturētajā kontrolgrupā jābūt vismaz 50 dzīvniekiem no katra dzimuma. Atkarībā no pētījuma mērķa galveno aplēšu statistisko nozīmību var palielināt, dzīvniekus dažādu devu grupās sadalot nevienmērīgi un mazāku devu grupās ietverot vairāk nekā 50 dzīvniekus, piemēram, lai aplēstu kancerogenitātes potenciālu mazu devu gadījumā. Tomēr ir jāapzinās, ka grupas lieluma neliels palielinājums tikai nedaudz paaugstinās pētījuma statistisko nozīmību. Grauzējiem katrā devas grupā, kas paredzēta pētījuma hroniskas toksicitātes posmam (kā izklāstīts 22. punktā), un līdztekus uzturētajā kontrolgrupā jābūt vismaz 10 dzīvniekiem no katra dzimuma. Jānorāda, ka šis skaits ir mazāks nekā hroniskās toksicitātes pētījumā (šā pielikuma B.30. nodaļa). Šā apvienotā pētījuma hroniskās toksicitātes posma datus, kas iegūti no grupām ar mazāku dzīvnieku skaitu, tomēr interpretēs ar tādu datu atbalstu, kas iegūti no lielāka dzīvnieku skaita pētījuma kancerogenitātes posmā. Pētījumos ar pelēm hroniskās toksicitātes posmā katras devas grupā var būt nepieciešami papildu dzīvnieki, lai varētu veikt visus vajadzīgos hematoloģiskos izmeklējumus. Papildu informācija par tādu pētījuma statistikas plānu un devu līmeņu izvēli, lai iespējami palielinātu statistisko nozīmību, ir sniegta Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

Dzīvnieku nonāvēšana testa laikā, satelītgrupa un indikatordzīvnieki

20. Lai iegūtu informāciju par tādu pārmaiņu norisi, kas nav neoplastiskas pārmaiņas, un mehānistisku informāciju, ja tas ir zinātniski pamatoti, pētījumā var paredzēt dzīvnieku nonāvēšanu testa laikā, piemēram, sestajā mēnesī hroniskās toksicitātes posmā. Ja šāda informācija jau ir pieejama no iepriekšējiem atkārtotas devas toksicitātes pētījumiem par testējamo ķīmisko vielu, dzīvnieku nonāvēšana testa laikā var nebūt zinātniski pamatota. No dzīvniekiem, ko izmanto pētījuma hroniskās toksicitātes posmā, kurš parasti ilgst 12 mēnešus (34. punkts), iegūst arī testa laikā izdarīto nonāvēšanu datus pētījuma kancerogenitātes posmam, tādējādi samazinot kopējo izmantoto dzīvnieku skaitu. Lai uzraudzītu jebkādu testējamās ķīmiskās vielas radīto toksikoloģisko pārmaiņu atgriezeniskumu, pētījuma hroniskās toksicitātes posmā var paredzēt arī satelītgrupas. Šādas grupas var nodrošināt tikai pētījuma augstākā devas līmeņa grupai un kontrolgrupai. Ja vajadzīgs, var izmantot papildu indikator-dzīvnieku grupu (parasti pieci dzīvnieki no katra dzimuma), lai pētījuma laikā pārraudzītu slimības stāvokli (30). Papildu norādījumi par to, kā plānot pētījumu, lai ietvertu nonāvēšanu testa laikā, satelītgrupas un indikator-dzīvniekus, vienlaikus līdz minimumam samazinot kopējo izmantoto dzīvnieku skaitu, ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).
21. Ja pētījuma plāns ietver satelītgrupas un/vai dzīvnieku nonāvēšanu testa laikā, to dzīvnieku skaits katras devas grupā, kas paredzēti šādiem nolūkiem, parasti būs 10 dzīvnieki no katra dzimuma, un pētījuma plānā ietvertais dzīvnieku kopskaits ir jāpalielina par to dzīvnieku skaitu, kurus paredzēts nonāvēt pirms pētījuma beigām. Dzīvniekiem, ko paredzēts nonāvēt testa laikā, un satelītgrupām parasti ir jāveic tādi paši novērojumi, tostarp jānovēro ķermeņa svars, barības/ūdens patēriņš, jāveic hematoloģiskie un klīniski bioķīmiskie mērījumi, kā arī patoloģiskie izmeklējumi, kā dzīvniekiem galvenā pētījuma hroniskās toksicitātes posmā, lai gan var arī paredzēt (grupām, ko plānots nonāvēt testa laikā), ka mērījumi jāveic tikai attiecībā uz tādiem īpašiem, svarīgiem parametriem kā neirotoksicitāte vai imūntoksicitāte.

Devu grupas un dozējums

22. Norādījumi par devu izvēli un intervāliem starp devu līmeņiem visos aspektos ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7). Gan hroniskās toksicitātes posmā, gan kancerogenitātes posmā ir jāizmanto vismaz trīs devu līmeņi un jānodrošina paralēla kontrole. Devu līmeņus parasti nosaka, pamatojoties uz īsākiem atkārtotas devas vai diapazona noteikšanas pētījumiem un ņemot vērā visus esošos toksikoloģiskos un toksikokinētiskos datus, kas ir pieejami par testējamo ķīmisko vielu vai tai radniecīgām ķīmiskajām vielām.

23. Pētījuma hroniskās toksicitātes posmā pilnu pētījumu ar trīs devu līmeņiem var uzskatīt par nevajadzīgu, ja var prognozēt, ka testā ar vienu vielas devas līmeni, kas ir vismaz 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā, netiks novērota nelabvēlīga ietekme. Tas jāpamato ar provizoriskos pētījumos iegūtu informāciju un apsvērumu, ka, balstoties uz datiem par strukturāli radniecīgām ķīmiskām vielām, var prognozēt, ka viela nebūs toksiska. Var piemērot ierobežojumu 1 000 mg uz kg ķermeņa svara dienā, izņemot gadījumu, ja cilvēka ekspozīcija liecina, ka jāizmanto augstāks devas līmenis.
24. Ja testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskās īpašības vai bioloģiskā iedarbība to neierobežo, augstākais devas līmenis jāizvēlas ar nolūku noteikt galvenos mērķorgānus un toksisko ietekmi, vienlaikus izvairoties radīt ciešanas, smagu toksicitāti, saslimstību un mirstību. Augstākais devas līmenis parasti jāizvēlas tāds, lai tas izraisītu toksicitātes pazīmes, kuras, piemēram, apliecina ķermeņa svara pieauguma samazinājums (apm. 10 %). Tomēr atkarībā no pētījuma mērķiem (sk. 6. punktu) var izvēlēties augstāko devas līmeni, kas ir zemāks par devu, kura nodrošina toksicitātes pazīmes, piemēram, ja deva izraisa būtisku nelabvēlīgu ietekmi, kas tomēr īpaši neietekmē mūža ilgumu vai ķermeņa svaru.
25. Devu līmeņus un intervālus starp devu līmeņiem var izvēlēties tāds, lai varētu noteikt devas un atbildes reakcijas sakarību un – atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas iedarbības veida – NOAEL vai citus paredzamos pētījuma rezultātus, piemēram, BMD (sk. 27. punktu). No faktoriem, kas ir jāapsver, nosakot mazākās devas, minams gaidāmais devas un atbildes reakcijas sakarības līknes slīpums un devas, kuru gadījumā var notikt svarīgas metabolisma vai toksiskās iedarbības veida pārmaiņas, ja ir gaidāms kāds sliekšnis vai ja ir gaidāms sākumpunkts zemu devu ekstrapolācijai. Veicot apvienoto kancerogenitātes un hroniskās toksicitātes pētījumu, galvenais mērķis būs iegūt informāciju kancerogenitātes riska novērtēšanas vajadzībām, savukārt informācija par hronisko toksicitāti parasti būs papildu mērķis. Tas ir jāpatur prātā, izvēloties pētījuma devu līmeņus un intervālus starp devu līmeņiem.
26. Izraudzītie intervāli starp devu līmeņiem būs atkarīgi no pētījuma mērķiem un testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, un šajā testēšanas metodes aprakstā tos nevar detalizēti norādīt, taču lejupejošu devu līmeņu noteikšanā labus testa rezultātus nereti nodrošina divkārtīgi līdz četrkārtīgi intervāli, un nereti ir ieteicams pievienot 4. testa grupu, nevis izmantot ļoti lielus intervālus starp dozējumiem (piemēram, pārsniedzot koeficientu 6–10). Parasti jāizvairās no tādu koeficientu izmantošanas, kas pārsniedz 10, un, ja tie tiek izmantoti, tas jāpamato.
27. Kā plašāk izklāstīts Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7), izvēloties devas, ir jāņem vērā šādi aspekti:
- devas un atbildes reakcijas sakarības zināmās vai prognozētās nelinearitātes vai liekuma punkti,
 - toksikokinētika un tādu devu diapazoni, kuru gadījumā ir vai nav vērojama metaboliskā inducēšanās, piesātināšanās vai nelinearitāte starp ārēji un iekšēji uzņemtām devām,
 - jau esoši bojājumi, ietekmes marķieri vai svarīgu, pamatā esošu bioloģisko procesu norises rādītāji,
 - iedarbības veida svarīgākie (vai paredzētie) aspekti, piemēram, devas, kuru gadījumā sākas citotoksicitāte, mainās hormonu līmeņi, tiek nomākti homeostatiskie mehānismi utt.,
 - devas un atbildes reakcijas sakarības līknes reģioni, kuros vajadzīgas sevišķi pamatīgas aplēses, piemēram, paredzamās BMD vai prognozētā sliekšņa diapazonā,
 - apsvērumi par paredzamiem cilvēka ekspozīcijas līmeņiem, it sevišķi vidējo un zemāko devu izvēlē.
28. Kontrolgrupa ir vielu nesāņēmusi grupa vai nesējvielas kontroles grupa, ja testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai izmanto nesējvielu. Izņemot testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanu, ar kontrolgrupas dzīvniekiem jārikojas tieši tāpat kā ar testa grupu dzīvniekiem. Ja izmanto nesējvielu, kontrolgrupa saņem lielāko devu grupām izmantoto nesējvielas tilpumu. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu un ja uztura garšas dēļ būtiski samazinās barības patēriņš, par piemērotāku kontrolgrupu var būt lietderīgi izmantot papildu grupu, ko baro tieši tāpat.

Devu sagatavošana un testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana

29. Testējamo ķīmisko vielu parasti ievada orāli ar uzturu vai dzeramo ūdeni vai ar mākslīgo barošanu. Papildu informācija par ievadīšanas ceļiem un metodēm ir sniegta Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7). Ievadīšanas ceļš un metode ir atkarīgi no pētījuma mērķa, testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, tās biopieejamības un cilvēka ekspozīcijas galvenā ceļa un metodes. Izraudzītais ievadīšanas ceļš un metode ir jāpamato. Dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ ievadīt ar mākslīgo barošanu parasti izvēlas tikai tādas preparātus, attiecībā

uz kuriem šāds ievadīšanas ceļš un paņēmieni pamatoti raksturo iespējamo cilvēka ekspozīciju (piemēram, farmaceitiskie preparāti). Uzturā vai vidē sastopamas ķīmiskās vielas, tostarp pesticīdus, parasti ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni. Tomēr dažiem scenārijiem, piemēram, ekspozīcija darbavietā, piemērotāki var būt citi ievadīšanas ceļi.

30. Ja vajadzīgs, testējamo ķīmisko vielu izšķīdina vai suspendē piemērotā nesējvielā. Pēc vajadzības ir jāņem vērā šādas nesējvielas un citu piedevu īpašības: ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas absorbciju, izplatīšanos, metabolismu vai aizturi; ietekme uz testējamās ķīmiskās vielas ķīmiskajām īpašībām, kuras var mainīt tās toksiskās īpašības; kā arī ietekme uz barības un ūdens patēriņu vai dzīvnieku barojumu. Ir ieteicams, ja vien iespējams, vispirms apsvērt ūdens šķīduma/suspensijas izmantošanu, pēc tam eļļas (piemēram, kukurūzas eļļas) šķīdumu/emulsiju un pēc tam iespējamu šķīdināšanu citās nesējvielās. Ja nesējviela nav ūdens, ir jāzina šīs nesējvielas toksiskās īpašības. Ir jābūt pieejamai informācijai par to, kā ievadīšanas metode (piemēram, ar uzturu) ietekmē testējamās ķīmiskās vielas stabilitāti un attiecīgi devu šķīduma vai uztura homogenitāti.
31. Ir svarīgi nodrošināt, lai ķīmiskajām vielām, kuras ievada ar uzturu vai dzeramo ūdeni, testējamās ķīmiskās vielas daudzumi neizjauktu parasto uztura vai ūdens līdzsvaru. Ilgturīgā toksicitātes pētījumos, kuros veic ievadīšanu ar uzturu, testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija barībā parasti nedrīkstētu pārsniegt augšējo robežu 5 % apmērā no kopējā uztura, lai nepieļautu uztura nelīdzsvarotību. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar uzturu, var izmantot vai nu nemainīgu koncentrāciju uzturā (mg uz kg uztura vai ppm), vai nemainīgu devas līmeni attiecībā pret dzīvnieka ķermeņa svaru (mg uz kg ķermeņa svara), ko aprēķina reizi nedēļā. Izmantotās alternatīvas ir jānorāda.
32. Orālas ievadīšanas gadījumā dzīvniekiem testējamās ķīmiskās vielas devu ievada katru dienu (septiņas dienas nedēļā) 12 mēnešus (hroniskais posms) vai 24 mēnešus (kancerogenitātes posms), sk. arī 33. un 34. punktu. Jebkuram citam devu došanas režīmam, piemēram, piecas dienas nedēļā, jābūt pamatotam. Ārīgas aplikācijas gadījumā dzīvniekus testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai parasti pakļauj vismaz sešas stundas dienā septiņas dienas nedēļā, kā noteikts šā pielikuma B.9. nodaļā (11), un tas ilgst 12 mēnešus (hroniskais posms) vai 24 mēnešus (kancerogenitātes posms). Inhalācijas ekspozīciju veic sešas stundas dienā septiņas dienas nedēļā, bet var izmantot arī ekspozīciju piecas dienas nedēļā, ja tas ir pamatoti. Ekspozīcijas periods parasti būs 12 mēneši (hroniskais posms) vai 24 mēneši (kancerogenitātes posms). Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti grauzēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var koriģēt tā, lai iespējami mazinātu attiecīgām sugām raksturīgās ciešanas. Ja izmanto ekspozīcijas ilgumus, kas ir mazāki par sešām stundām dienā, tas jāpamato. Sk. arī šā pielikuma B.8. nodaļu (9).
33. Ja testējamo ķīmisko vielu dzīvniekiem ievada ar mākslīgo barošanu, tas jādara ar kuņģa zondi vai piemērotu intubācijas cauruli vienos un tajos pašos laikos katru dienu. Parasti reizi dienā ievada vienreizēju devu; ja, piemēram, ķīmiskā viela ir lokāls kairinātājs, ikdienas devu var nodrošināt, to ievadot kā daļītu devu (divreiz dienā). Maksimālais šķidrums tilpums, ko vienā paņēmienā var ievadīt, ir atkarīgs no testējamā dzīvnieka lieluma. Tilpumam jābūt iespējami mazākam, un grauzējiem tas parasti nedrīkstētu pārsniegt 1 ml uz 100 g ķermeņa svara (31). Testa tilpuma mainība ir jāsamazina līdz minimumam, koncentrāciju koriģējot tā, lai visos devu līmeņos tilpums būtu vienāds. Izņēmums ir iespējami kairinošas vai kodīgas ķīmiskās vielas, kas ir jāatšķaida, lai izvairītos no smagas lokālas iedarbības. Ir jāizvairās no tādu koncentrāciju testēšanas, kas, visticamāk, būs kodīgas vai kairinošas kuņģa un zarnu traktam.

Pētījuma ilgums

34. Šā pētījuma hroniskā posma devu došanas periods un ilgums parasti būs 12 mēneši, lai gan pētījuma plāns pieļauj arī (un to var izmantot, lai veiktu) īsākus (piemēram, sešu vai deviņu mēnešu) vai garākus (piemēram, 18 vai 24 mēnešu) pētījumus atkarībā no konkrētu tiesisko regulējumu prasībām vai konkrētiem mehānistiskiem mērķiem. Ja izraugās ekspozīcijas periodu, kas nav 12 mēneši, tas jāpamato, it sevišķi, ja šis periods ir mazāks. Visu devu grupas, kas ietvertas šajā posmā, paredzētajā termiņā tiks nonāvētas, lai izvērtētu hronisko toksicitāti un ar neoplastiku nesaistītas patoloģijas. Satelītgrupas, kas ir ietvertas, lai uzraudzītu jebkādu testējamās ķīmiskās vielas radīto toksikoloģisko pārmaiņu atgriezeniskumu, vismaz četras nedēļas un ne ilgāk kā vienu trešdaļu kopējā pētījuma laika pēc ekspozīcijas pārtraukšanas ir jātur bez devu ievadīšanas.
35. Šā pētījuma kancerogenitātes posma ilgums grauzējiem parasti būs 24 mēneši, kas ir lielākā daļa izmantojamo dzīvnieku parastā mūža ilguma. Var izmantot īsākus vai garākus pētījuma ilgumus atkarībā no pētījumā izmantoto dzīvnieku sugu līnijas mūža ilguma, bet tas ir jāpamato. Konkrētām peļu līnijām, piemēram, AKR/J, C3H/J vai C57BL/6J līnijām, piemērotāki varētu būt 18 mēneši. Turpmāk doti daži norādījumi par ilgumu,

pētījuma izbeigšanu un izdzīvošanu; papildu norādījumi, tostarp apsvērumi par to, kad attiecībā uz izdzīvošanu pētījumā pieņem, ka kancerogenitātes pētījums ir negatīvs, ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7).

- Pētījuma izbeigšana ir jāapsver gadījumā, ja izdzīvojušo dzīvnieku skaits zemāko devu grupās vai kontrolgrupā ir zem 25 %.
- Tādā gadījumā, ja toksicitātes dēļ priekšlaicīgi nobeidzas tikai augstākās devas grupa, pētījumu nevajadzētu izbeigt.
- Katra dzimuma izdzīvošana ir jāaplūko atsevišķi.
- Ja no pētījuma pieejamie dati vairs nav pietiekami statistiski derīgi izvērtēšanai, pētījumu nevajadzētu turpināt.

NOVĒROJUMI (HRONISKĀS TOKSICITĀTES POSMS)

36. Visi dzīvnieki ir jāpārbauda, lai konstatētu saslimstību vai mirstību, parasti katras dienas sākumā un beigās, arī nedēļas nogalēs un brīvdienās. Jāizdara vispārīgi klīniski novērojumi vismaz reizi dienā, vēlams vienā(-os) laikā(-os) katru dienu, ņemot vērā gaidāmo ietekmju maksimuma laiku pēc devas ievadīšanas, ja ir izmantota mākslīgā barošana.
37. Visiem dzīvniekiem vismaz vienreiz pirms pirmās ekspozīcijas (lai vienam un tam pašam dzīvniekam varētu izdarīt salīdzināšanu), pētījuma pirmās nedēļas beigās un reizi mēnesī pēc tam ir jāveic detalizēti klīniskie novērojumi. Novērojumu protokols jāparedz tāds, lai iespējami samazinātos variācijas starp atsevišķiem novērotājiem un lai tās nebūtu atkarīgas no testa grupas. Šie novērojumi ir jāveic ārpus dzīvnieka turēšanas būra, ieteicams, standartnožogojumā un visos gadījumos vienos un tajos pašos laikos. Novērojumi ir rūpīgi jāreģistrē, vēlams, izmantojot vērtēšanas sistēmu, ko skaidri noteikusi testēšanas laboratorija. Ir jācenšas nodrošināt, lai novērošanas apstākļu variācijas būtu minimālas. Protokolējamās pazīmēs cita starpā jāiekļauj ādas, apmatojuma, acu, gļotādas, sekrēcijas un izdalījumu, kā arī veģetatīvās aktivitātes pārmaiņas (piemēram, asarošana, piloarekcija, acs zīlītes diametra pārmaiņas un neraksturīga elpošana). Jāreģistrē arī pārmaiņas gaitā, stājā un atbildes reakcijās uz manipulācijām, kā arī kloniskas vai toniskas kustības, stereotipiska (piemēram, pārmērīga apmatojuma laižšana, atkārtota ripkošana) vai savāda uzvedība (piemēram, pašsakropļošanās, staigāšana at muguriski) (32).
38. Ar oftalmoskopu vai ar citu piemērotu ierīci visiem dzīvniekiem pirms testējamās ķīmiskās vielas pirmās ievadīšanas ir jāveic oftalmoloģiska izmeklēšana. Pētījuma beigās šo izmeklēšanu ieteicams veikt visiem dzīvniekiem vai vismaz dzīvniekiem lielāko devu un kontroles grupās. Ja atklāj ar vielas saņemšanu saistītas pārmaiņas acīs, jāpārbauda visi dzīvnieki. Ja strukturāla analīze vai cita informācija liecina par toksicitāti acīs, jāpalielina acu izmeklēšanas biežums.
39. Ķīmiskām vielām, kurām iepriekšējos atkārtotas devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos ir konstatēts potenciāls radīt neirotoksisku ietekmi, var pēc izvēles novērtēt to izraisītās sensoriskās reakcijas uz dažāda veida kairinājumiem (32) (piemēram, dzirdes, redzes un proprioceptīvajiem kairinājumiem) (33) (34) (35), satveršanas stiprumu (36) un motorisko aktivitāti (37), pirms sāk pētījumu, kā arī ik pa trijiem mēnešiem pēc pētījuma sākšanas līdz 12 mēnešiem (ieskaitot) un arī pētījuma beigās (ja tas ir garāks par 12 mēnešiem). Sīkāki dati par procedūrām, kuras var izmantot, ir sniegti attiecīgajos atsauču avotos. Tomēr var izmantot arī alternatīvas procedūras, nevis tikai tās, kuras minētas atsauču avotos.
40. Ķīmiskām vielām, kurām iepriekšējos atkārtotas devas 28 dienu un/vai 90 dienu toksicitātes testos ir konstatēts potenciāls radīt imūntoksisku ietekmi, pētījuma beigās šo beigupunktu var pēc izvēles izmeklēt vēl papildus.

Ķermeņa svars, barības/ūdens patēriņš un barības efektivitāte

41. Visi dzīvnieki jānosver vielas ievadīšanas sākumā, pēc tam vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī turpmāk. Barības patēriņa un barības efektivitātes mērījumi ir jāizdara vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam. Ūdens patēriņš ir jāmēra vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam, ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar dzeramo ūdeni. Jāapsver, vai ūdens patēriņa mērījumus neizdarīt arī pētījumos ar mainītu dzeršanas aktivitāti.

Hematoloģija un klīniskā bioķīmija

42. Pētījumos ar grauzējiem hematoloģiskie izmeklējumi ir jāveic visiem pētījuma dzīvniekiem (10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā grupā) trešajā, sestajā un divpadsmitajā mēnesī, kā arī pētījuma beigās (ja tas ir garāks par 12 mēnešiem). Lai varētu veikt visus vajadzīgos hematoloģiskos izmeklējumus pelēm (sk. 19. punktu), var būt vajadzīgi satelītgrupas dzīvnieki. Tādu sugu gadījumā, kas nav grauzēji, paraugus ņem no mazāka skaita dzīvnieku (piemēram, četri dzīvnieki no katra dzimuma un katrā grupā, ja pētījumu veic ar suņiem) un to dara paraugu ņemšanas laikos testa laikā un pētījuma beigās, kā aprakstīts attiecībā uz grauzējiem. Mērījumi trešajā mēnesī ne grauzējiem, ne sugām, kas nav grauzēji, nav jāveic, ja hematoloģiskie parametri nav uzrādījuši nekādu iedarbību iepriekšējā 90 dienu pētījumā, kurš veikts ar salīdzināmiem devas līmeņiem. Asins paraugi ir jāņem no precīzi norādītās vietas, piemēram, ar sirds punktēšanu vai no retroorbitālā sinusa, dzīvnieku anestezējot.
43. Jāizmeklē šādi parametri (38): leukocītu kopējais un diferenciālais skaits, eritrocītu skaits, trombocītu skaits, hemoglobīna koncentrācija, hematokrits (hematokrita skaitlis), vidējais korpuskulārais tilpums (MCV), vidējais korpuskulārais hemoglobīns (MCH), vidējā korpuskulārā hemoglobīna koncentrācija (MCHC), protrombīna laiks un aktivizētais daļējais tromboplastīna laiks. Pēc vajadzības atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes var mērīt arī citus hematoloģijas parametrus, piemēram, Heinca ķermenīšus vai citus netipiskas morfoloģijas eritrocītus, vai methemoglobīnu. Kopumā jāpiemēro elastīga pieeja atkarībā no attiecīgās testējamās ķīmiskās vielas novērotās un/vai prognozētās ietekmes. Ja testējamā ķīmiskā viela ietekmē hematopoētisko sistēmu, var norādīt arī retikulocītu skaitu un kaulu smadzeņu citoloģiju, lai gan šie mērījumi parasti nav jāveic.
44. Asins paraugiem, kas iegūti no visiem pētījuma dzīvniekiem (10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā grupā) ar tādiem pašiem laika intervāliem, kā norādīts hematoloģiskajiem izmeklējumiem, ir jāveic klīniski bioķīmiskie izmeklējumi, lai noteiktu būtisku toksisku ietekmi audos un tieši ietekmi uz nierēm un aknām. Lai varētu veikt visus vajadzīgos klīniski bioķīmiskos izmeklējumus pelēm, var būt vajadzīgi satelītgrupas dzīvnieki. Tādu sugu gadījumā, kas nav grauzēji, paraugus ņem no mazāka skaita dzīvnieku (piemēram, četri dzīvnieki no katra dzimuma un katrā grupā, ja pētījumu veic ar suņiem) un to dara paraugu ņemšanas laikos testa laikā un pētījuma beigās, kā aprakstīts attiecībā uz grauzējiem. Mērījumi trešajā mēnesī ne grauzējiem, ne sugām, kas nav grauzēji, nav jāveic, ja klīniski bioķīmiskie parametri nav uzrādījuši nekādu iedarbību iepriekšējā 90 dienu pētījumā, kurš veikts ar salīdzināmiem devas līmeņiem. Ir ieteicams dzīvniekiem pirms asins paraugu ņemšanas uz nakti nedot barību (izņemot peles) ⁽¹⁾. Jāizmeklē šādi parametri (38): glikoze, urīnviela (urīnvielas slāpekļis), kreatinīns, kopējais olbaltums, albumīns, kalcījs, nātrijs, kālijs, kopējais holesterīns, vismaz divi attiecīgi hepatocelulārās izvērtēšanas testi (alanīna aminotransferāze, aspartāta aminotransferāze, glutamātdehidrogenāze, kopējās žultskābes) (39), kā arī vismaz divi attiecīgi hepatobiliāro novērtējumu testi (alkalīnā fosfatāze, gamma glutamiltransfēraze, 5'-nukleotidāze, kopējais bilirubīns, kopējās žultskābes) (39). Pēc vajadzības atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes var mērīt arī citus klīniski bioķīmiskos parametrus, tādus kā tukšas dūšas triglicerīdi, konkrēti hormoni un holīnesterāze. Kopumā jāpiemēro elastīga pieeja atkarībā no attiecīgās testējamās ķīmiskās vielas novērotās un/vai prognozētās ietekmes.
45. Urīnanalīzes ir jāveic visiem pētījuma dzīvniekiem (10 tēviņiem un 10 mātītēm katrā grupā), izmantojot paraugus, kas ievākti ar tādiem pašiem intervāliem kā hematoloģiskās un klīniski bioķīmiskās analīzes. Mērījumi trešajā mēnesī nav jāveic, ja urīnanalīze nav uzrādījusi nekādu iedarbību iepriekšējā 90 dienu pētījumā, kurš veikts ar salīdzināmiem devas līmeņiem. Ekspertu ieteikumā par klīniskās patoloģijas pētījumiem norādīti šādi parametri (38): izskats, tilpums, osmolaritāte vai īpatnējais svars, pH, kopējais olbaltums un glikoze. No citiem mērījumiem jāmin ketons, urobilinogēns, bilirubīns un slēptās asinis. Vajadzības gadījumā, lai paplašinātu novērotās ietekmes izpēti, var izmantot papildu parametrus.
46. Parasti tiek uzskatīts, ka pētījumos ar suņiem pirms vielas ievadīšanas ir vajadzīgi hematoloģiskie un klīniski bioķīmiskie mainīgie izejlielumi, bet pētījumos ar grauzējiem tie nav jānosaka (38). Tomēr, ja vēsturiskie izejdati (sk. 58. punktu) ir nepietiekami, jāapsver iespēja šādus datus iegūt.

*PATOĻOĢIJA**Pilna autopsija*

47. Visiem pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem parasti veic pilnu, detalizētu autopsiju, ieskaitot ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa dobumu, torakālā dobuma, vēdera dobuma, kā arī šo dobumu satura rūpīgu apskati. Tomēr var arī paredzēt (grupām, ko plānots nonāvēt testa laikā, vai satelītgrupām), ka mērījumi jāveic tikai attiecībā uz tādiem īpašiem, svarīgiem parametriem kā neirotoksicitāte vai imūntoksicitāte (sk. 21. punktu). Šiem dzīvniekiem nav jāveic autopsija un sekojošajos punktos aprakstītās turpmākās procedūras. Indikatordzīvniekiem var būt vajadzīga autopsija (vajadzību izskata katrā gadījumā atsevišķi, un lēmumu pieņem pētījuma vadītājs).

⁽¹⁾ Dažiem mērījumiem serumā un plazmā, jo īpaši glikozes mērījumiem, ir vēlams dzīvniekiem pirms asins ņemšanas uz nakti nedot barību. Tas ir vēlams galvenokārt tāpēc, ka barības uzņemšana neizbēgami izraisītu palielinātu mainību, kam būtu tendence maskēt neizteiktu iedarbību un kas apgrūtinātu interpretēšanu. Tomēr barības nedošana uz nakti var traucēt dzīvnieku vispārīgo vielmaiņu un – jo īpaši barošanas pētījumos – var izjaukt testējamās ķīmiskās vielas ikdienas iedarbību. Visi dzīvnieki ir jānovērtē vienādā fizioloģiskā stāvoklī, tādēļ detalizētus novērtējumus vai neiroloģiskos novērtējumus ir jāplāno veikt citā dienā, nevis dienā, kad ņem klīniski bioķīmiskos paraugus.

48. Orgānu svars ir jānosaka visiem dzīvniekiem, izņemot tos, kas ir izslēgti saskaņā ar 47. punkta pēdējo daļu. Visu dzīvnieku (izņemot dzīvniekus, kas atrasti mirstoši un/vai ir nonāvēti pētījuma laikā) virsnieru dziedzeri, smadzenes, sēklinieku piedēkļi, sirds, nieres, aknas, olnīcas, liesa, sēklinieki, vairogdziedzeris (nosvērts pēc fiksācijas kopā ar epitēlijķermenīšiem) un dzemde ir pēc vajadzības jāatbrīvo no visiem apkārtējiem audiem, un, lai izvairītos no izžūšanas, iespējami drīz pēc secēšanas jānoteic natīvais svars.
49. Fiksācijas šķīdumā, kas ir vispiemērotākais gan konkrētā veida audu izmeklēšanai, gan paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai (40), ir jāsauglabā turpmāk norādītie audi (kvadrātieķavās dotie audi nav obligāti).

Visi makroskopiskie bojājumi	Sirds	Aizkuņģa dziedzeris	Kuņģis (priekškuņģis, dziedzeri)
Virsnieru dziedzeris	Līkumainā zarna	Epitēlijķermenīši	[Zobi]
Aorta	Tukšā zarna	Perifērais nervs	Sēklinieki
Smadzenes (tostarp galveno smadzeņu, smadzeņu un iegareno smadzeņu / smadzeņu tilta izgriezumi)	Nieres	Hipofīze	Tīms
Aklā zarna	Asaru dziedzeri (ārpusorbītas)	Prostata	Vairogdziedzeris
Dzemes kakls	Aknas	Taisnā zarna	[Mēle]
Koagulācijas dziedzeris	Plaušas	Siekalu dziedzeris	Traheja
Lokzarna	Limfmezgli (gan virspusējie, gan dziļie)	Sēklas pūslīši	Urīnpūslis
Divpadsmitpirkstu zarna	Piena dziedzeris (obligāti mātītēm un, ja iespējams secēt, tēviņiem arī)	Skeleta muskuļu paraugs	Dzemde un dzemes kakls
Sēklinieku piedēkļi	[Augšējās elpošanas sistēmas orgāni, tostarp deguns, deguna gliemežnīca un paranasālais sinuss]	Āda	[Urīnvads]
Acs (arī tīklene)	Barības vads	Muguras smadzenes (trīs līmeņos: kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona smadzenes)	[Urīnizvadkanāls]
[Augšstilbs ar locītavu]	[Ožas sīpols]	Liesa	Maksts
Žultspūslis (sugām, kas nav žurka)	Olnīcas	[Krušu kauls]	Kaulu smadzeņu izgriezumus un/vai svaigs kaulu smadzeņu aspirāts
Hardera dziedzeris			

Pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāsauglabā abi orgāni. Klīnisko un citu konstatējumu rezultātā var rasties vajadzība papildus izmeklēt citus audus. Jāsauglabā arī orgāni, ko, pamatojoties uz zināmām testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, uzskata par iespējamiem mērķorgāniem. Pētījumos ar ārgu aplikāciju ir jāsauglabā tie paši orgāni, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālu ievadīšanu, un ir nepieciešams īpašā veidā ņemt un saglabāt ādas paraugus no aplikācijas vietas. Inhalācijas pētījumos saglabāto un izmeklēto elpošanas sistēmas audu sarakstam ir jāatbilst šā pielikuma B.8. nodaļas (9) un šā pielikuma B.29. nodaļas (10) noteikumiem. Kas attiecas uz citiem orgāniem/audiem (un papildus īpašā veidā saglabātajiem elpošanas sistēmas audiem), izmeklē orgānus, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālu ievadīšanu.

Histopatoloģija

50. Ir pieejami norādījumi par labāko praksi toksikoloģiskās patoloģijas pētījumu veikšanā (40). Ir jāveic vismaz šādi histopatoloģiskie izmeklējumi:

— visi audi no lielākās devas grupām un kontrolgrupām,

- visi audi no dzīvniekiem, kas nomiruši vai nonāvēti pētījuma laikā,
- visi audi, kam ir makroskopiskas anomālijas,
- mērķaudi vai audi, kas uzrāda ar ievadišanu saistītas pārmaiņas lielākās devas grupā, no visiem dzīvniekiem visu pārējo devu grupās,
- pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāizmeklē abi orgāni.

NOVĒROJUMI (KANCEROGENITĀTES POSMS)

51. Visi dzīvnieki ir jāpārbauda, lai konstatētu saslīmstību vai mirstību, parasti katras dienas sākumā un beigās, arī nedēļas nogalēs un brīvdienās. Reizi dienā turklāt jāpārbauda, vai dzīvniekiem nav parādījušās konkrētas toksikoloģiski būtiskas pazīmes. Ja pētījumos izmanto mākslīgo barošanu, dzīvnieki ir jāpārbauda periodā tūlīt pēc devas ievadišanas. Īpaši uzmanīgi jāseko audzēju attīstībai, reģistrējot katra skaidri saskatāma vai sataustāma audzēja parādīšanās brīdi, atrašanās vietu, izmērus, izskatu un turpmāko attīstību.
52. Visi dzīvnieki jānosver vielas ievadišanas sākumā, pēc tam vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī turpmāk. Barības patēriņa un barības efektivitātes mērījumi ir jāizdara vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam. Ūdens patēriņš ir jāmēra vismaz reizi nedēļā pirmās 13 nedēļas un vismaz reizi mēnesī pēc tam, ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar dzeramo ūdeni. Jāapsver, vai ūdens patēriņa mērījumus neizdarīt arī pētījumos ar mainītu dzeršanas aktivitāti.

Hematoloģija, klīniskā bioķīmija un citi mērījumi

53. Lai no pētījuma iegūtu iespējami vairāk informācijas, it sevišķi attiecībā uz iedarbības veida apsvērumiem, var ņemt asins paraugus hematoloģiskajiem un klīniski bioķīmiskajiem izmeklējumiem, lai gan lēmumu par to pieņem pētījuma vadītājs. Piemērotas var būt arī urīnanalīzes. Informāciju par šiem parametriem sniegs dati par dzīvniekiem, kas izmantoti pētījuma hroniskās toksicitātes posmā, kurš parasti ilgst 12 mēnešus (34. punkts). Papildu norādījumi par šādu paraugu ņemšanas vērtību kancerogenitātes pētījuma ietvaros ir sniegti Norādījumu dokumentā Nr. 116 (7). Ja ņem asins paraugus, tie jāievāc testa perioda beigās tieši pirms dzīvnieku nonāvēšanas procedūras vai tās laikā. Asins paraugi ir jāņem no precīzi norādītas vietas, piemēram, ar sirds punktēšanu vai no retroorbitālā sinusa, dzīvnieku anestezējot. Izmeklēšanai var sagatavot arī asins uztriepes, it sevišķi, ja ir konstatējams, ka kaula smadzenes ir mērķorgāns, lai gan šāda asins uztriepju izmeklējuma vērtība kancerogēnā/onkogēnā potenciāla novērtēšanā kancerogenitātes posmā ir tikusi apšaubīta (38).

PATOĻOĢIJA

Pilna autopsija

54. Visiem pētījumā izmantotajiem dzīvniekiem, izņemot indikatordzīvniekus (sk. 20. punktu) un citus satelītgrupas dzīvniekus, veic pilnu, detalizētu autopsiju, ieskaitot ķermeņa ārējās virsmas, visu atveru un galvaskausa dobumu, torakālā dobuma, vēdera dobuma, kā arī šo dobumu satura rūpīgu apskati. Indikatordzīvniekiem un citiem satelītgrupas dzīvniekiem var būt vajadzīga autopsija (vajadzību izskata katrā gadījumā atsevišķi, un lēmumu pieņem pētījuma vadītājs). Orgānu svara noteikšana parasti neietilpst kancerogenitātes pētījumā, jo geriatriskas pārmaiņas un – vēlākā posmā – audzēju attīstība mazina orgānu svara datu lietderību. Tomēr orgānu svaru noteikt var būt ļoti svarīgi apliecinājuma nozīmes izvērtēšanā un pēc tā it sevišķi var spriest par iedarbības veidu. Ja orgānu svara noteikšana ietilpst satelītpētījumā, dati ir jāievāc ne vēlāk kā vienu gadu pēc pētījuma sākšanas.
55. Fiksācijas šķīdumā, kas ir vispiemērotākais gan konkrētā veida audu izmeklēšanai, gan paredzētajai turpmākajai histopatoloģiskajai izmeklēšanai (40), ir jāsiglabā turpmāk sarakstā norādītie audi (kvadrāntiekavās dotie audi nav obligāti).

Visi makroskopiskie bojājumi	Sirds	Aizkuņģa dziedzeris	Kuņģis (priekškuņģis, dziedzeri)
Virsnieru dziedzeris	Likumainā zarna	Epitēlijķermenīši	[Zobi]
Aorta	Tukšā zarna	Perifērais nervs	Sēklinieki
Smadzenes (tostarp galveno smadzeņu, smadzenīšu un iegareno smadzeņu / smadzeņu tilta izgriezumus)	Nieres	Hipofīze	Tīms
Aklā zarna	Asaru dziedzeri (ārpusorbits)	Prostata	Vairogdziedzeris

Dzemes kakls	Aknas	Taisnā zarna	[Mēle]
Koagulācijas dziedzeris	Plaušas	Siekalu dziedzeris	Traheja
Lokzarna	Limfmezgli (gan virspusējie, gan dziļie)	Sēklas pūslīši	Urīnpūslis
Divpadsmitpirkstu zarna	Piena dziedzeris (obligāti mātītēm un, ja iespējams secēt, tēviņiem arī)	Skeleta muskuļu paraugs	Dzemde un dzemes kakls
Sēklinieku piedēkļi	[Augšējās elpošanas sistēmas orgāni, tostarp deguns, deguna gliemežnīca un paranasālais sinuss]	Āda	[Urīnvads]
Acs (arī tīkls)	Barības vads	Muguras smadzenes (trīs līmeņos: kakla, vidējā torakālā un gurnu rajona smadzenes)	[Urīnizvadkanāls]
[Augšstilbs ar locītavu]	[Ožas sīpols]	Liesa	Maksts
Žultspūslis (sugām, kas nav žurka)	Olnīcas	[Krūšu kauls]	Kaulu smadzeņu izgriezums un/vai svaigs kaulu smadzeņu aspirāts
Hardera dziedzeris			

Pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāsaņem abi orgāni. Klīnisko un citu konstatējumu rezultātā var rasties vajadzība papildus izmeklēt citus audus. Jāsaņem arī orgāni, ko, pamatojoties uz zināmām testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, uzskata par iespējamiem mērķorgāniem. Pētījumos ar ārstu aplikāciju ir jāsaņem tie paši orgāni, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālu ievadīšanu, un ir nepieciešams īpašā veidā ņemt un saglabāt ādas paraugus no aplikācijas vietas. Inhalācijas pētījumos saglabāto un izmeklēto elpošanas sistēmas audu sarakstam ir jāatbilst šā pielikuma B.8. nodaļas (8) un šā pielikuma B.29. nodaļas (9) ieteikumiem. Kas attiecas uz citiem orgāniem/audiem (un papildus īpašā veidā saglabātajiem elpošanas sistēmas audiem), izmeklē orgānus, kas norādīti sarakstā attiecībā uz orālo ievadīšanu.

Histopatoloģija

56. Ir pieejami norādījumi par labāko praksi toksikoloģiskās patoloģijas pētījumu veikšanā (40). Ir jāizmeklē vismaz šādi audi:

- visi audi no lielākās devas grupām un kontrolgrupām,
- visi audi no dzīvniekiem, kas nomiruši vai nonāvēti pētījuma laikā,
- visi audi, kam ir makroskopiskas anomālijas, tostarp audzēji,
- ja lielākās devas grupā ir novērotas ar vielas saņemšanu saistītas histopatoloģiskās pārmaiņas, tie paši audi ir jāizmeklē visu pārējo devu grupu dzīvniekiem,
- pāra orgānu, piemēram, nieru, virsnieru, gadījumā ir jāizmeklē abi orgāni.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA (KANCEROGENITĀTE UN HRONISKĀ TOKSICITĀTE)

Dati

57. Attiecībā uz visiem novērtētajiem parametriem ir jāsniedz dati par atsevišķiem dzīvniekiem. Turklāt visi dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot dzīvnieku skaitu testa sākumā, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā ir nobeigušies vai humānu apsvērumu dēļ nonāvēti, un katras nobeigšanās vai humānās nonāvēšanas laiku, to dzīvnieku skaitu, kuriem novērotas toksicitātes pazīmes, novēroto toksicitātes pazīmju aprakstu, ieskaitot toksiskās ietekmes sākuma laiku, ilgumu un smagumu, to dzīvnieku skaitu, kuriem novēroti audu bojājumi, bojājumu veidus un to dzīvnieku procentuālo īpatsvaru, kuriem parādījušies katra tipa bojājumi. Kopsavilkuma datu tabulās ir jānorāda vidējie lielumi un standartnovirzes (ilgstošu testu datiem) attiecībā uz dzīvniekiem, kam novērota toksiska ietekme vai bojājumi, kā arī bojājumi ir jāklasificē.

58. Interpretējot pētījuma rezultātus, var noderēt vēsturiskie kontroldati, piemēram, gadījumā, ja ir norādes, ka dati, kas iegūti paralelajā kontrolē, būtiski atšķiras no neseniem datiem par kontrolgrupas dzīvniekiem tajā pašā testēšanas kompleksā/kolonijā. Ja izvērtē vēsturiskus datus, tiem jābūt no tās pašas laboratorijas un jāattiecas uz vienāda vecuma un līnijas dzīvniekiem, un jābūt iegūtiem pēdējo piecu gadu laikā pirms attiecīgā pētījuma.
59. Ja vajadzīgs, skaitliskie rezultāti jānovērtē ar piemērotu un vispārpieņemtu statistikas metodi. Statistikas metodes un analizējamie dati ir jāizvēlas pētījuma plānošanas posmā (9. punkts). Izvēli izdarot, jāparedz iespēja vajadzības gadījumā to koriģēt attiecībā uz izdzīvošanu.
60. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela:

- fizikālās īpašības, tīrība un fizikālķīmiskās īpašības,
- identifikācijas dati,
- ķīmiskās vielas izcelsme,
- sērijas numurs,
- ķīmiskās analīzes sertifikāts.

Nesējiela (attiecīgā gadījumā):

- nesējvielas izvēles pamatojums (ja nesējiela nav ūdens).

Testa dzīvnieki:

- izmantotās sugas/līnija un izvēles pamatojums,
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums testa sākumā,
- izcelsme, turēšanas apstākļi, uzturs utt.,
- katra dzīvnieka svars testa sākumā.

Testēšanas apstākļi:

- ievadišanas ceļa un devu izvēles pamatojums,
- attiecīgā gadījumā statistikas metodes, kas izmantotas datu analizēšanai,
- sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas maisījuma/uztura preparātu,
- analītiski dati par sasniegto preparāta koncentrāciju, stabilitāti un homogenitāti,
- testējamās ķīmiskās vielas ievadišanas ceļš un sīka informācija par ievadišanu,
- inhalācijas pētījumiem – vai tika izmantota tikai deguna vai visa ķermeņa ekspozīcija,
- testējamās ķīmiskās vielas faktiskās devas (mg uz kg ķermeņa svara dienā) un attiecīgā gadījumā koeficients, ar kuru testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju (mg/kg vai ppm) barībā / dzeramajā ūdenī pārreķinātu faktiskajā devā,
- sīka informācija par barības un ūdens kvalitāti.

Rezultāti (gan kopsavilkuma dati tabulā, gan atsevišķu dzīvnieku dati)

Vispārīgi:

- izdzīvošanas dati,
- ķermeņa svars / ķermeņa svara maiņas,
- barības patēriņš, barības efektivitātes aprēķini, ja tie ir veikti, un attiecīgā gadījumā ūdens patēriņš,
- toksikokinētiskie dati, ja pieejami,
- oftalmoskopija (ja pieejama),
- hematoloģija (ja pieejama),
- klīniskā ķīmija (ja pieejama).

Klīniskie konstatējumi:

- toksicitātes pazīmes,
- visu anomāliju biežums (un, ja notiek klasificēšana, smagums),
- klīniski novērotas ietekmes veids, smagums un ilgums (pārejoša vai pastāvīga).

Autopsijas dati:

- ķermeņa svars pēc nonāvēšanas,
- orgānu svars un to attiecības, ja vajadzīgs,
- autopsijas atrade; anomāliju biežums un smagums.

Histopatoloģija:

- histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultāti, kas nav saistīti par neoplastiku,
- neoplastikas histopatoloģiskā atrade,
- korelācijas starp makroskopisku un mikroskopisku atradi,
- visu ar ievadišanu saistīto histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultātu sīks apraksts, kurā ietverta arī smaguma klasifikācija,
- ziņojums par priekšmetstikliņu salīdzinošo izvērtēšanu.

Rezultātu statistiskā apstrāde pēc vajadzības

Komentāri par rezultātiem, arī:

- modelēšanas pieeju iztirzājums,
- devas un atbildes reakcijas sakarības,
- vēsturiskie kontroldati,

— apsvērumi par informāciju attiecībā uz iedarbības veidu,

— BMD, NOAEL vai LOAEL noteikšana,

— būtiskums cilvēkam.

Secinājumi

LITERATŪRA

- (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) Šā pielikuma B.27. nodaļa "Subhroniskās orālās toksicitātes tests – atkārtoto devu 90 dienu orālās toksicitātes pētījums ar dzīvniekiem, kas nav grauzēji".
- (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) Šā pielikuma B.8. nodaļa "Subakūtā inhalācijas toksicitāte: 28 dienu pētījums".
- (10) Šā pielikuma B.29. nodaļa "Subhroniskā inhalācijas toksicitāte: 90 dienu pētījums".
- (11) Šā pielikuma B.9. nodaļa "Atkārtotās devas (28 dienu) toksicitāte (ādas)".
- (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.
- (27) Eiropas Parlamenta un Padomes 2010. gada 22. septembra Direktīva 2010/63/ES par zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzību (OV L 276, 20.10.2010., 33. lpp.).
- (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.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJA

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.”;

7) pielikuma B.36. nodaļu aizstāj ar šādu:

“B.36. TOKSIKOKINĒTIKA

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 417 (TG) (2010. gads). Pētījumus, kuros izmeklē testējamās ķīmiskās vielas toksikokinētiku, veic, lai iegūtu pietiekamu informāciju par šīs vielas absorbciju, izplatīšanos, biotransformāciju (t. i., metabolismu) un ekskrēciju nolūkā sasaistīt koncentrāciju vai devu ar novēroto toksicitāti un izprast toksicitātes mehānismu. Toksikokinētika var palīdzēt izprast toksikoloģiskos pētījumus, parādot, ka testa dzīvnieki tiek sistemātiski pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai, un atklājot, kuras ir cirkulējošās molekulārās struktūrdaļas (ķīmiskā pamatviela / metabolīti). Šajos pētījumos noteiktie toksikokinētiskie pamatparametri arī sniegs informāciju par testējamās ķīmiskās vielas iespējamu akumulēšanos audos un/vai orgānos un iespējamu biotransformācijas inducēšanos testējamās ķīmiskās vielas iedarbības rezultātā.
2. Toksikokinētikas dati var palīdzēt novērtēt, cik pietiekami un būtiski dzīvnieku toksicitātes dati ir ekstrapolēšanai uz novērtējumu par apdraudējumu un/vai risku cilvēkam. Turklāt toksikokinētikas pētījumi var dot informāciju, kas noder, lai noteiktu devu līmeņus toksicitātes pētījumiem (lineārā kinētika attiecībā pret nelineāro kinētiku), ievadīšanas ceļa ietekmi un biopieejamību un lai noskaidrotu jautājumus, kas saistīti ar pētījuma plānu. Dažu veidu toksikokinētikas datus var izmantot uz fizioloģiju pamatota toksikokinētikas (PBTk) modeļa izstrādē.
3. Metabolītu/toksikokinētikas datiem ir svarīga nozīme, piemēram, tie var norādīt uz iespējamo toksicitāti un iedarbības veidiem, kā arī uz to sakaru ar devas līmeni un ekspozīcijas ceļu. Turklāt metabolisma dati var sniegt informāciju, kas var noderēt, lai novērtētu, cik toksikoloģiski būtiska ir eksogēni radušos testējamās ķīmiskās vielas metabolītu iedarbība.
4. Attiecīgi toksikokinētikas dati palīdzēs pamatot struktūras un aktivitātes kvantitatīvo sakarību un analogijas principa jeb grupēšanas pieejas turpmāko pieņemamību un piemērojamību ķīmisko vielu drošuma izvērtēšanā. Kinētikas dati var noderēt, arī lai izvērtētu citu pētījumu (piemēram, *in vivo/in vitro*) toksikoloģisko būtiskumu.
5. Ja vien nav minēts cits ievadīšanas ceļš (sk. 74.–78. punktu), šī testēšanas metode ir piemērojama testējamās ķīmiskās vielas orālai ievadīšanai.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

6. Regulatīvajām sistēmām ir dažādas prasības un vajadzības attiecībā uz to beigupunktu un parametru mērīšanu, kas saistīti ar dažādu kategoriju ķīmisko vielu (piemēram, pesticīdu, biocīdu, rūpniecisko ķīmisko vielu) toksikokinētiku. Pretēji lielākajai daļai testēšanas metožu šajā testēšanas metodē ir paredzēta ar vairākiem mērījumiem vai beigupunktiem saistīta toksikokinētiskā testēšana. Nākotnē var tikt izstrādāti viens vai vairāki jauni testēšanas metožu apraksti un/vai norādījumu dokumenti, lai katru beigupunktu aprakstītu atsevišķi un detalizētāk. Šīs testēšanas metodes gadījumā veicamie testi vai novērtējumi ir atkarīgi no katras regulatīvās sistēmas prasībām un/vai vajadzībām.
7. Ir vairāki pētījumi, ko var veikt, lai regulatīvām vajadzībām izvērtētu testējamās ķīmiskās vielas toksikokinētiskās īpašības. Tomēr atkarībā no konkrētajām regulatīvajām vajadzībām vai situācijām ne visi no šiem iespējamiem pētījumiem var būt vajadzīgi, lai izvērtētu testējamo ķīmisko vielu. Toksikokinētikas pētījumu plānošanā jārikojas elastīgi, ņemot vērā pētītās testējamās ķīmiskās vielas īpašības. Dažos gadījumos, lai novērtētu ar testējamo ķīmisko vielu saistīto apdraudējumu un riskus, var būt jāizpēta tikai kāds atsevišķs jautājumu kopums. Dažkārt toksikokinētikas datus var vākt citu toksikoloģisku pētījumu izvērtēšanas ietvaros. Savukārt citos gadījumos atkarībā no regulatīvajām vajadzībām un/vai no jauniem jautājumiem, kas rodas testējamās ķīmiskās vielas izvērtēšanas laikā, var būt vajadzīgi papildu un/vai plašāki toksikokinētikas pētījumi.
8. Lai uzlabotu pētījuma kvalitāti un izvairītos no nevajadzīgas dzīvnieku izmantošanas, pirms pētījuma veikšanas testēšanas laboratorijai ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu un attiecīgajiem metabolītiem un to analogiem. Tas varētu ietvert datus, kas iegūti ar citām attiecīgām testēšanas metodēm (*in vivo* pētījumiem, *in vitro* pētījumiem un/vai *in silico* izvērtējumiem). Pētījuma plānošanā no rezultātu interpretēšanā var

noderēt ķīmiskās vielas fizikālķīmiskās īpašības, piemēram, oktanola/ūdens sadalījuma koeficients (kas izteikts kā $\log P_{OW}$), pKa, šķīdība ūdenī, tvaika spiediens un molekulmasa. Šīs īpašības var noteikt, izmantojot attiecīgas metodes, kā aprakstīts attiecīgajās testēšanas metodēs.

IEROBEŽOJUMI

9. Šī testēšanas metode nav izstrādāta īpašiem apstākļiem, piemēram, grūsniem vai zīdīšiem dzīvniekiem vai mazulīem, vai lai izvērtētu iespējamās atliekas eksponētos produktīvajos dzīvniekos. Tomēr pētījumā ar B.36 iegūtie dati var dot pamatinformāciju, ko var izmantot, plānojot konkrētus pētījumus šo jautājumu noskaidrošanai. Šī testēšanas metode nav paredzēta nanomateriālu testēšanai. Ziņojumā par ESAO testēšanas norādījumu provizorisko pārskatīšanu attiecībā uz to piemērojamību nanomateriāliem ir norādīts, ka TG 417 (kas ir līdzvērtīgi B.36. testēšanas metodei) nanomateriāliem piemērot nedrīkst (1).

DEFINĪCIJAS

10. Šajā testēšanas metodē izmantotās definīcijas ir sniegtas papildinājumā.

DZĪVNIEKU LABTURĪBAS APSVĒRUMI

11. Norādījumi par humānu attieksmi pret dzīvniekiem ir pieejami ESAO Norādījumu dokumentā (GD) Nr. 19 (2). Attiecībā uz visiem šajā testēšanas metodē aprakstītajiem *in vivo* un *in vitro* pētījumiem ieteicams izmantot ESAO GD 19.

METOŽU APRAKSTS

Ievadpētījumi

12. Lai noteiktu toksikokinētikas pētījumu eksperimentālos parametrus (piemēram, metabolismu, masas bilanci, analītiskās procedūras, devas noteikšanu, CO₂ izgarojumus utt.), ir ieteicams un vēlams izmantot ievadpētījumus. Dažu šo parametru noteikšana var nozīmēt, ka nav vajadzīgs izmantot radioaktīvi iezīmētas ķīmiskās vielas.

Dzīvnieku izvēle

Sugas

13. Toksikokinētikas testos ieteicams izmantot tās pašas dzīvnieku sugas (un līniju), ko izmanto citos toksikoloģiskos pētījumos ar interesējošo testējamo ķīmisko vielu. Parasti jāizmanto žurkas, jo tās toksikoloģiskos pētījumos jau tiek plaši izmantotas. Citas vai papildu sugas var būt pamats izmantot tad, ja svarīgi toksikoloģiski pētījumi apliecina šīm sugām būtisku toksicitāti vai ja ir pieejamas liecības, ka to toksicitāte/toksikokinētika uz cilvēku ir vairāk attiecināma. Dzīvnieku sugas un līnijas izvēle ir jāpamato.
14. Ja vien nav minēts citādi, šajā testēšanas metodē testējamā suga ir žurka. Lai izmantotu citas testējamās sugas, var būt vajadzīgs grozīt dažus metodes aspektus.

Vecums un līnija

15. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši dzīvnieki (parasti devu ievadīšanas brīdī 6–12 nedēļas veci) (sk. arī 13. un 14. punktu). Ja izmanto dzīvniekus, kas nav jauni pieauguši dzīvnieki, tas jāpamato. Pētījuma sākumā visiem dzīvniekiem jābūt vienādā vecumā. Atsevišķu dzīvnieku svara atšķirības nedrīkst pārsniegt $\pm 20\%$ no testa grupas dzīvnieku vidējā svara. Vislabāk ir izmantot to pašu līniju, kas izmantota testējamās ķīmiskās vielas toksikoloģiskās datubāzes izveidē.

Dzīvnieku skaits un dzimums

16. Katrai testētajai devai jāizmanto vismaz četri viena dzimuma dzīvnieki. Izmantoto dzīvnieku dzimums jāpamato. Ja ir pamats uzskatīt, ka pastāv būtiskas ar dzimumu saistītas toksicitātes atšķirības, jāapsver, vai neizmantojot abus dzimumus (četrus tēviņus un četras mātītes).

Turēšanas un barošanas apstākļi

17. Testa periodā dzīvnieki parasti ir jātur atsevišķi. Īpašos apstākļos var būt pamatota turēšana grupā. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā. Temperatūrai eksperimenta dzīvnieku turēšanas telpā jābūt $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$), savukārt relatīvajam mitrumam jābūt $30\text{--}70\%$. Var izmantot parasto laboratorijas barību ar neierobežotu piekļuvi dzeramajam ūdenim.

Testējamā ķīmiskā viela

18. Visos pētījuma masas bilances un metabolītu noteikšanas aspektos ir jāizmanto ar ^{14}C radioaktīvi iezīmēta testējamā ķīmiskā viela; tomēr, ja var pierādīt, ka:

- masas bilanci un metabolītus var pienācīgi noteikt, izmantojot neiezīmētu testējamo ķīmisko vielu,
- ar neradioaktīvu testējamo ķīmisko vielu izmantotās metodes analītiskais specifiskums un jutīgums ir vienlīdzīgs ar vai lielāks par to, ko varētu sasniegt ar radioaktīvi iezīmētu testējamo ķīmisko vielu,

radioaktīvi iezīmēta testējamā ķīmiskā viela nav jāizmanto. Turklāt var izmantot citus radioaktīvus un stabilus izotopus, it sevišķi, ja šis elements ir atbildīgs par testējamās ķīmiskās vielas toksisko daļu vai tajā ietilpst. Ja iespējams, radioaktīvi iezīmējamam atomam ir jāatrodas molekulas pamatdaļā, kas ir metaboliski stabila (nepieļādas apmaiņai, nav metaboliski noārdāma līdz CO_2 un neklūst par daļu no organisma vienoglekļa krājuma). Lai varētu izsekot testējamās ķīmiskās vielas metaboliskajai aprītei, var būt vajadzīgs iezīmēt vairākas molekulas vietas vai konkrētus rajonus.

19. Radioaktīvi iezīmētās un neiezīmētās testējamās ķīmiskās vielas ir ar attiecīgām metodēm jāanalizē, lai noteiktu to tīrību un identitāti. Radioaktīvas testējamās ķīmiskās vielas radioaktīvajai tīrībai jābūt augstākajai, kāda attiecīgajai testējamajai ķīmiskajai vielai ir sasniedzama (vēlams, augstākai par 95 %), un iespēju robežās jācenšas noteikt piemaisījumus, kuru saturs ir 2 % un vairāk. Tīrība, kā arī visu konstatēto piemaisījumu identitāte un saturs ir jānorāda ziņojumā. Atsevišķas regulatīvas programmas var sniegt papildu norādījumus, kas palīdzētu definēt un specificēt ķīmiskās vielas, kuras ir maisījumi, un aprakstīt metodes, kā noteikt tīrību.

Devu izvēle*Ievadpētījums*

20. Parasti ievadpētījumam pietiek ar vienreizēju orālu devu. Devai jābūt netoksiskai, bet pietiekami augstai, lai ekskrētā (un attiecīgā gadījumā plazmā) būtu iespējams noteikt metabolītus, kā arī lai sasniegtu noteikto ievadpētījuma mērķi, kā norādīts šīs testēšanas metodes 12. punktā.

Galvenie pētījumi

21. Galvenajiem pētījumiem ir vēlams izmantot vismaz divas devas, jo no vismaz divām devu grupām ievāktā informācija var palīdzēt noteikt devas citiem toksicitātes pētījumiem, kā arī novērtēt devas un atbildes reakcijas sakarības jau pieejamos toksicitātes testos.
22. Ja tiek ievadītas divas devas, abām devām jābūt pietiekami augstām, lai ekskrētā (un attiecīgā gadījumā plazmā) būtu iespējams noteikt metabolītus. Izvēloties devas, jāņem vērā informācija, kas iegūstama no jau pieejamajiem toksicitātes datiem. Ja informācija (piemēram, no akūtās orālās toksicitātes pētījumiem, kuros reģistrētas toksicitātes klīniskās pazīmes, vai no atkārtotas devas toksicitātes pētījumiem) nav pieejama, augstākajai devai varbūt var izmantot vērtību, kas nepārsniedz aplēsto LD_{50} (orālai ievadīšanai un ārīgai aplikācijai) vai LC_{50} (inhālācijai) vai kas nepārsniedz aplēstā akūtās toksicitātes diapazona zemāko vērtību. Zemākajai devai jābūt kādai daļai no augstākās devas.
23. Ja tiek pētīts tikai viens devas līmenis, devai vēlams būt pietiekami augstai, lai ekskrētā (un attiecīgā gadījumā plazmā) būtu iespējams noteikt metabolītus, neradot acīmredzamu toksicitāti. Jāpamato, kāpēc nav paredzēts otrs devas līmenis.
24. Ja ir jānosaka devas ietekme uz kinētiskajiem procesiem, ar divām devām var nepietikt un vismaz vienai devai jābūt pietiekami augstai, lai šos procesus piesātinātu. Ja apgabals zem līknes, kas raksturo koncentrāciju plazmā un laiku (AUC) starp diviem galvenajiem pētījumiem izmantotajiem devu līmeņiem nav lineārs, ļoti iespējams, ka vienam vai vairākiem kinētiskajiem procesiem kaut kur starp šiem diviem devu līmeņiem iestājas piesātinājums.
25. Testējamām ķīmiskām vielām ar zemu toksiskumu ir jāizmanto maksimālā deva 1 000 mg uz kg ķermeņa svara (orālai ievadīšanai un ārīgai aplikācijai) (ja vielu ievada ar inhalāciju, sk. šā pielikuma B.2. nodaļu; parasti šī deva nepārsniedz 2 mg/l). Attiecībā uz konkrētām ķīmiskām vielām no regulatīvām prasībām var izrietēt augstākas devas. Devu izvēle vienmēr ir jāpamato.

26. Lai noteiktu akumulācijas un/vai noturības potenciālu, var pietikt ar datiem par vienreizējas devas toksikokinētiku un izplatīšanos audos. Tomēr dažos gadījumos var būt vajadzīga atkārtotu devu ievadīšana, i) lai pilnīgāk izpētītu akumulācijas un/vai noturības potenciālu vai toksikokinētiskas pārmaiņas (t. i., piemēram, enzīmu indukcija un inhibīcija) vai ii) ja to paredz piemērojamā regulatīvā sistēma. Pētījumos ar atkārtotām devām parasti pietiek ar atkārtotas zemas devas ievadīšanu, taču dažos gadījumos var būt arī vajadzīga atkārtotas augstas devas ievadīšana (sk. arī 57. punktu).

Testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana

27. Testējamā ķīmiskā viela ir homogēni jāizšķīdina vai jāsuspendē tajā pašā nesējvielā, kas izmantota pārējiem orālās (ar mākslīgo barošanu) toksicitātes pētījumiem ar testējamo ķīmisko vielu, ja šāda informācija par nesējvielu ir pieejama. Nesējvielas izvēle jāpamato. Nesējviela un devas tilpums ir jāizvēlas, pētījumu plānojot. Parasti ievadīšanu veic ar mākslīgo barošanu, taču noteiktās situācijās piemērotāka var būt ievadīšana ar želatīna kapsulu vai ar piejaukumu barībai (abos gadījumos tas jāpamato). Ir jāpārbauda un jānorāda katram dzīvniekam faktiski ievadītā deva.
28. Maksimālais šķidruma tilpums, ko vienā paņēmienā ievada ar mākslīgo barošanu, ir atkarīgs no testa dzīvnieku lieluma, devas nesējvielas veida un no tā, vai pirms testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas dzīvniekus baro vai nebaro. Jāpamato barības došana vai ierobežošana pirms devu došanas. Parasti gan ūdens, gan neūdens nesējvielu gadījumā tilpumam jābūt iespējami mazākam. Grauzējiem devu tilpumam parasti nevajadzētu pārsniegt 10 ml uz kg ķermeņa svara. To nesējvielu tilpums, ko izmanto lipofīlākām testējamām ķīmiskām vielām, var būt no 4 ml uz kg ķermeņa svara. Atkārtotajām devām, kuru gadījumā nebūtu ieteicams dzīvniekiem dienām ilgi ierobežot uzturu, jāapsver mazāki devu tilpumi (piemēram, 2–4 ml uz kg ķermeņa svara). Kad iespējams, jāapsver iespēja izmantot devas tilpumu, kas atbilst tilpumam, kuru ievadīja citos orālās (ar mākslīgo barošanu) toksicitātes pētījumos ar testējamo ķīmisko vielu.
29. Lai noteiktu biopieejamību vai relatīvo orālo absorbciju, var izmantot testējamās ķīmiskās vielas intravenozu ievadīšanu un testējamās ķīmiskās vielas mērīšanu asinīs un/vai ekskretēs. Intravenozajam pētījumam testējamās ķīmiskās vielas vienreizēju devu (parasti tā ir vienāda ar zemāko orāli ievadīto devu, bet to nepārsniedz, sk. devu izvēli) ievada, izmantojot piemērotu nesējvielu. Šis materiāls ir jāievada piemērotā tilpumā (piemēram, 1 ml uz kg ķermeņa svara) izraudzītajā ievadīšanas vietā vismaz četriem attiecīgā dzimuma dzīvniekiem (ja nepieciešams, var izmantot abus dzimumus, sk. 16. punktu). Testējamās ķīmiskās vielas intravenozai ievadīšanai ir vajadzīgs pilnībā izšķīdināts vai suspendēts devas preparāts. Intravenozās ievadīšanas nesējvielai nevajadzētu ietekmēt asins sastāvu vai asins plūsmu. Ja testējamo ķīmisko vielu ievada ar infūziju, infūzijas ātrums ir jānorāda ziņojumā un jāstandartizē starp dzīvniekiem – ja tiek izmantots infūzijas sūkņis. Ja kanula testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanai un/vai asins ņemšanai tiek ievietota jūga vēnā vai ja ievadīšanai tiek izmantota femorālā artērija, ir jāizmanto anestēzija. Anestēzijas veids ir pienācīgi jāapsver, jo tas var ietekmēt toksikokinētiku. Pirms tiek ievadīta testējamā ķīmiskā viela kopā ar nesējvielu, dzīvniekiem ir jāļauj pienācīgi atgūties.
30. Dažām testējamām ķīmiskām vielām, ņemot vērā to fizikālķīmiskās īpašības, kā arī paredzamo izmantošanu vai iedarbību uz cilvēku, var būt izmantojami citi ievadīšanas ceļi, piemēram, ārīga aplikācija un inhalācija (sk. 74.–78. punktu).

Mērījumi

Masas balance

31. Masas bilanci nosaka, ievadītās (radioaktīvās) devas procentuālo daļu, kas izdalījusies ar urīnu, ekskrementiem un izelpoto gaisu, summējot ar procentuālo daļu, kas ir audos, liķa pārējā daļā un būra mazgājamā ūdenī (sk. 46. punktu). Parasti par pietiekamu uzskata ievadītās testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) kopējo atgūstamību apmēram > 90 %.

Absorbcija

32. Absorbcijas sākotnējās aplēses var noteikt, no masas balances aprēķina izslēdzot devas procentuālo daļu kuņģa un zarnu traktā un/vai ekskrementos. Par procentuālās absorbcijas aprēķināšanu sk. 33. punktu. Par ekskretu izmeklēšanu sk. 44.–49. punktu. Ja absorbcijas apmēru pēc orālas ievadīšanas nevar precīzi noteikt, izmantojot masas balances pētījumus (piemēram, ja ekskrementos ir vairāk nekā 20 % no ievadītās devas), var būt vajadzīgi turpmāki pētījumi. Šie pētījumi varētu ietvert vai nu 1) testējamās ķīmiskās vielas orālu ievadīšanu un izmērīšanu žultī, vai 2) testējamās ķīmiskās vielas orālu un intravenozu ievadīšanu un tās klātbūtnes izmērīšanu urīnā, un, abu ievadīšanas ceļu gadījumā, izelpotajā gaisā un liķī. Gan vienā, gan otrā pētījuma plānā kā testējamās ķīmiskās vielas un tās metabolītu konkrētās analīzes surogātmēti paredz radioaktivitātes mērīšanu.
33. Ja izvēlas žults ekskrecijas pētīšanu, parasti izmanto orālu ievadīšanu. Šajā pētījumā vismaz četri attiecīgā dzimuma (vai, ja nepieciešams, abu dzimumu) dzīvnieku žultsceļos ir jāievieto kanulas un jāievada testējamās ķīmiskās vielas vienreizēja deva. Pēc testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanas jāmonitorē radioaktivitātes vai testējamās ķīmiskās vielas ekskrecija, to darot žultī tik ilgi, cik vajadzīgs, lai varētu aplēst šādā ceļā izdalījušos ievadītās devas procentuālo daļu, pēc kuras iespējams tieši aprēķināt orālās absorbcijas apmēru, izmantojot šādu formulu:

Procentuālā absorbcija = $(\text{daudzums žultī} + \text{urīnā} + \text{izelpotajā gaisā} + \text{liķi bez kuņģa un zarnu trakta satura}) / \text{ievadītais daudzums} \times 100$

34. Dažu testējamo ķīmisko vielu kļau gadījumā var notikt absorbētās devas tieša sekrēcija caur zarnu membrānām. Tādos gadījumos neuzskata, ka dati, ko pēc orālās devas ievadīšanas žurkai iegūst, ar žultsceļā ievadītas kanulas palīdzību izmērot šīs devas procentuālo daļu ekskrementos, atspoguļo neabsorbēto devas daļu. Gadījumos, kuros uzskata, ka ir notikusi sekrēcija zarnās, par absorbēto devas procentuālo daļu var spriest pēc absorbcijas, kas aprēķināta, ekskreciju pēc orālās ievadīšanas salīdzinot ar ekskreciju pēc intravenozas ievadīšanas (žurka bez kanulas vai žurka, kuras žultsceļā ievietota kanula) (sk. 35. punktu). Ja uzskata, ka jākvantificē sekrēcija zarnās, ir arī ieteicams pēc intravenozas devas ievadīšanas izmērīt ekskreciju žurkai, kuras žultsceļā ievietota kanula.

Biopieejamība

35. Biopieejamību var 50.–52. punktā aprakstītajā veidā noteikt pēc orālās un intravenozās grupas plazmas/asins kinētikas, izmantojot testējamās ķīmiskās vielas un/vai attiecīgā metabolīta vai metabolītu konkrētu ķīmisko analīzi, tāpēc radioaktīvi iezīmēta testējamā ķīmiskā viela nav vajadzīga. Testējamās ķīmiskās vielas vai attiecīgā metabolīta vai metabolītu biopieejamību (F) var aprēķināt šādi:

$$F = (AUC_{exp}/AUC_{IV}) \times (Deva_{IV}/Deva_{exp}),$$

kur AUC ir apgabals zem līknes, kas raksturo sakarību starp koncentrāciju plazmā un laiku, bet *exp* ir eksperimentā izmantotais ievadīšanas ceļš (orāli, ārīgi aplikācija vai inhalācija).

36. Sistēmiskās iedarbības riska novērtēšanā dzīvnieku pētījumos konstatētās sistēmiskās koncentrācijas salīdzinot ar analogiskiem biomonitoringa datiem, kas iegūti pētījumos par darbinieku ekspozīciju, toksiskā komponenta biopieejamībai parasti tiek dota priekšroka salīdzinājumā ar procentuālo absorbciju. Situāciju var būt sarežģītāka, ja devas ir nelineārā diapazonā, tāpēc toksikokinētiskā skrīnīgā ir svarīgi devas noteikt lineārā diapazonā.

Vielas izplatīšanās audos

37. Informācija par testējamās ķīmiskās vielas un/vai tās metabolītu izplatīšanos audos ir svarīga, lai noteiktu mērķaudus un izprastu toksicitātes pamatā esošos mehānismus, kā arī lai iegūtu informāciju par testējamās ķīmiskās vielas un metabolīta akumulācijas un noturības potenciālu. Kopējās (radioaktīvās) devas procentuālā daļa audos, kā arī liķa pārējā daļā ir jāmēra vismaz ekskrecijas eksperimenta beigās (piemēram, atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas īpašībām parasti līdz septiņu vai mazāk dienu laikā pēc devas došanas). Ja pētījuma beigās testējamā ķīmiskā viela audos netiek konstatēta (piemēram, jo īsā pussabrukšanas perioda dēļ tā ir, iespējams, tikusi izvadīta no organisma pirms pētījuma beigām), jāraugās, lai dati netiktu interpretēti kļūdaini. Šādās situācijās vielas izplatīšanās audos ir jānoteic laikā, kad testējamās ķīmiskās vielas (un/vai metabolītu) koncentrācija plazmā/asinīs vai ekskrecija ar urīnu ir maksimāla (T_{max}) pēc vajadzības (sk. 38. punktu). Turklāt var būt vajadzīga audu ievākšana papildu laikos, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas un/vai tās metabolītu izplatīšanos audos, izvērtētu atkarību no laika (attiecīgā gadījumā), kā arī lai vieglāk būtu noteikt masas bilanci un/vai lai izpildītu kompetentās iestādes prasības. Jāievāc tādi audi kā aknas, taukaudi, kuņģa un zarnu trakta audi, nieres, liesa, asinis pilnā sastāvā, atlikušais liķis un mērķorgānu audi, kā arī jebkādi citi audi (piemēram, vairogziedzera audi, eritrocīti, reproduktīvie orgāni, āda, acs (it sevišķi pigmentētiem dzīvniekiem), kas varētu būt svarīgi testējamās ķīmiskās vielas toksikoloģiskajā izvērtēšanā. Lai iespējami labāk izmantotu dzīvniekus, kā arī tad, ja subhroniskās vai hroniskās toksicitātes pētījumos tiek konstatēta toksicitāte mērķorgānos, jāapsver, vai tajos pašos laikos neizdarīt vēl kādu audu analīzes. Ziņojumā arī jānorāda (radioaktīvo) atlieku koncentrācija un audu un plazmas (asins) attiecības.
38. Var būt arī nepieciešams vai kompetentās iestādes prasīts vielas izplatīšanos audos izvērtēt papildu laikos, piemēram, laikā, kad koncentrācija plazmā/asinīs ir maksimāla (piemēram, T_{max}), vai laikā, kad maksimumu sasniegusi ekskrecija ar urīnu (šo laiku noteic attiecīgajos plazmas/asins kinētikas vai ekskrecijas eksperimentos). Šī informācija var būt noderīga, lai izprastu toksicitāti un testējamās ķīmiskās vielas un tās metabolītu akumulācijas un noturības potenciālu. Paraugu izvēle jāpamato. Analīzes paraugi parasti jāņem no tiem pašiem audiem, kas minēti iepriekš (sk. 37. punktu).
39. Pētījumos par vielas izplatīšanās audos radioaktivitāti var kvantificēt, izmantojot orgānu secēšanu, homogenizāciju, sadedzināšanu un/vai šķīdināšanu, kurai seko uztverto atlikumu skaitīšana ar šķīduma scintilāciju (LSC) metodi. Nosakot testējamās ķīmiskās vielas izplatīšanos orgānos un/vai audos, noderīgi var būt daži jauni paņēmieni, kas pašlaik ir dažādās izstrādes stadijās, piemēram, kvantitatīvā visa ķermeņa autoradiogrāfija un receptoru mikroskopiskā autoradiogrāfija (3) (4).
40. Ja papildus orālai ekspozīcijai tiek izmantoti citi ekspozīcijas ceļi, ir jāievāc un jāanalizē specifiski audi, piemēram, plaušu audi inhalācijas pētījumos un ādas audi ārīgās aplikācijas pētījumos. Sk. 74.–78. punktu.

Metabolisms

41. Lai varētu noteikt un kvantificēt nepārveidotu testējamo ķīmisko vielu un tās metabolītus, ir jāievāc ekskrets (un attiecīgā gadījumā plazma), kā aprakstīts 44.–49. punktā. Lai attiecīgajā devas grupā būtu vieglāk noteikt metabolītus, ir pieņemami ekskretu apvienot. Ir ieteicams profilēt katra perioda metabolītus. Tomēr, ja parauga trūkuma un/vai radioaktivitātes dēļ tas nav iespējams, ir pieņemami apvienot dažādu laiku urīnu un ekskrementus, bet nav pieņemama apvienošana starp dažādiem dzimumiem vai devām. Ar attiecīgām kvalitatīvām un kvantitatīvām metodēm ir jāanalizē urīns, ekskrementi, radioaktīvais izelpotais gaiss no dzīvniekiem, kuri iepriekš saņēmuši devu, un attiecīgā gadījumā žults.
42. Pēc iespējas jācenšas noteikt visus metabolītus, kuru procentuālais īpatsvars no ievadītās devas ir 5 % vai lielāks, un ziņojumā jānorāda testējamās ķīmiskās vielas metabolisma shēma. Ir jānosaka testējamās ķīmiskās vielas, par kurām ir konstatēts, ka to daudzums ekskretā ir 5 % un vairāk no ievadītās devas. Ar noteikšanu saprotama komponentu precīza strukturāla noskaidrošana. Parasti noteikšanu īsteno vai nu ar metabolīta paralēlu hromatogrāfiju ar zināmām standartvielām, izmantojot divas atšķirīgas sistēmas, vai ar paņēmieniem, ar kuriem ir iespējama pozitīva strukturāla noteikšana, piemēram, ar maspektrometriju, kodolmagnētisko rezonansi (NMR) utt. Paralēlas hromatogrāfijas gadījumā hromatogrāfijas paņēmienus, kuros izmanto vienu un to pašu stacionāro fāzi ar divām atšķirīgām šķīdinātāju sistēmām, neuzskata par pietiekamu metabolīta identitātes verificēšanu ar divām metodēm, jo šīs metodes nav neatkarīgas. Noteikšana ar paralēlu hromatogrāfiju ir jāīsteno, izmantojot divas atšķirīgas, analītiski neatkarīgas sistēmas, piemēram, reversās un normālās fāzes plānslāņa hromatogrāfiju (TLC) un augstas izšķirtspējas šķīdumhromatogrāfiju (HPLC). Ja hromatogrāfiskā nošķiršana ir pietiekami kvalitatīva, papildu apstiprināšana ar spektroskopiju nav vajadzīga. Viennozīmīga noteikšana ir arī iespējama, izmantojot metodes, kas sniedz strukturālu informāciju, piemēram: šķīdumhromatogrāfija/maspektrometrija (LC-MS) vai šķīdumhromatogrāfija/tandēmveida maspektrometrija (LC-MS/MS), gāzhromatogrāfija/maspektrometrija (GC-MS) un NMR spektrometrija.
43. Ja nav iespējama tādu metabolītu noteikšana, kuru procentuālais īpatsvars no ievadītās devas ir 5 % vai lielāks, galaziņojumā tas jāpamato/jāpaskaidro. Lai testējamās ķīmiskās vielas apdraudējuma un/vai riska novērtēšanā varētu labāk izprast metabolisko ceļu, var būt lietderīgi noteikt arī metabolītus, kuru ir mazāk nekā 5 % no ievadītās devas. Kad vien iespējams, jānodrošina strukturāls apstiprinājums. Tas var ietvert profilēšanu plazmā, asinīs vai citos audos.

Ekskrēcija

44. Ievadītās devas ekskrēcijas ātrums un apmērs ir jānosaka, mērot no urīna, ekskrementiem un izelpotā gaisa atgūtās (radioaktīvās) devas procentuālo īpatsvaru. Šie dati arī palīdzēs noteikt masas bilanci. Testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) daudzumi, kas ir izvadīti no organisma ar urīnu, ekskrementiem un izelpoto gaisu, ir jānosaka ar piemērotiem laika intervāliem (sk. 47.–49. punktu). Atkārtotas devas eksperimenti ir pienācīgi jāplāno, lai būtu iespējams ievākt ekskrēcijas datus, kas vajadzīgi, lai sasniegtu 26. punktā aprakstītos mērķus. Tad šos eksperimentus būs iespējams salīdzināt ar vienreizējas devas eksperimentiem.
45. Ja ievadpētījumā ir konstatēts, ka ar izelpoto gaisu netiek izvadīts būtisks daudzums testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) (saskaņā ar 49. punktu), galīgajā pētījumā ievākt izelpoto gaisu nav nepieciešams.
46. Katrs dzīvnieks ir jāievieto atsevišķā metabolisma kamerā, lai varētu ievākt ekskretu (urīnu, ekskrementus un izelpoto gaisu). Katra ievākšanas perioda beigās (sk. 47.–49. punktu), lai nodrošinātu iespējami labāku testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) atgūstamību, metabolisma kameras ir jāizskalo ar piemērotu šķīdinātāju (šis ir tā sauktais "būru mazgājamais ūdens"). Ekskrēta ievākšana jābeidz septiņu dienu laikā vai pēc tam, kad ir atgūti vismaz 90 % no ievadītās devas (atkarībā no tā, kas notiek ātrāk).
47. Testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) kopējie daudzumi urīnā ievākšanas pirmajā dienā jānosaka vismaz divas reizes, no kurām vienai jābūt 24. stundā pēc devas ievadīšanas, savukārt pēc tam līdz pētījuma beigām noteikšana jāveic reizi dienā. Pirmajā dienā ir ieteicams izvēlēties vairāk nekā divus paraugu ņemšanas laikus (piemēram, 6., 12. un 24. stundā). Ievadpētījumu rezultāti ir jāanalizē, lai iegūtu informāciju par citādiem vai papildu ievākšanas laikiem. Ievākšanas grafiki ir jāpamato.
48. Testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) kopējie daudzumi ekskrementos ir jānosaka reizi dienā, sākot ar 24. stundu pēc devas ievadīšanas, līdz pētījuma beigām, ja vien ievadpētījumi neliel ievadīšanas laikus mainīt vai papildināt. Citādi ievākšanas grafiki ir jāpamato.
49. Izelpotā CO₂ un citu gaistošo materiālu ievākšanu attiecīgā pētījuma eksperimentā var izbeigt, ja, 24 stundas ievācot izelpoto gaisu, tajā netiek konstatēts vairāk par 1 % no ievadītās devas.

Gaitas pētījumi*Plazmas/asins kinētika*

50. Šo pētījumu mērķis ir aplēst testējamās ķīmiskās vielas toksikokinētikas pamatparametrus (piemēram, C_{max} , T_{max} , pussabrukšanas periods ($t_{1/2}$), AUC). Šos pētījumus var veikt ar vienu devu vai, drīzāk, ar divām vai vairāk devām. Devas ir jāizvēlas atkarībā no eksperimenta rakstura un/vai pētītās problēmas. Kinētikas dati var būt vajadzīgi, lai noskaidrotu tādus jautājumus kā testējamās ķīmiskās vielas biopieejamība un/vai lai noskaidrotu devas ietekmi uz klirensu (piemēram, lai noskaidrotu, vai klirensa piesātinājums ir atkarīgs no devas).
51. Šiem pētījumiem jāizmanto vismaz četri viena dzimuma dzīvnieki katrā grupā. Izmantoto dzīvnieku dzimums jāpamato. Ja ir liecības, ka pastāv būtiskas, ar dzimumu saistītas toksicitātes atšķirības, jāapsver, vai neizmantot abus dzimumus (četrus tēviņus un četras mātītes).
52. Pēc testējamās (radioaktīvi iezīmētās) ķīmiskās vielas ievadīšanas no katra dzīvnieka piemērotos laikos jāņem asins paraugi, izmantojot attiecīgu paraugu ņemšanas metodiku. No katra dzīvnieka ņemamo asins paraugu tilpumu un skaitu var ierobežot atkārtotas paraugu ņemšanas iespējamā ietekme uz dzīvnieka veselību/fizioloģiju un/vai analītiskās metodes jutīgumu. Ir jāanalizē katra atsevišķa dzīvnieka paraugi. Dažos gadījumos (piemēram, metabolītu raksturošana) var būt nepieciešams apvienot paraugus no vairākiem dzīvniekiem. Apvienotie paraugi ir nepārprotami jāidentificē, un apvienošana ir jāpaskaidro. Ja izmanto radioaktīvi iezīmētu testējamo ķīmisko vielu, var pietikt ar to, ka analizē kopējo radioaktivitāti. Tādā gadījumā kopējā radioaktivitāte ir jāanalizē pilnā asins ainā un plazmā vai plazmā un sarkanajos asinsķermenīšos, lai būtu iespējams aprēķināt attiecību starp saturu asinīs un plazmā. Citos gadījumos var būt vajadzīgi specifiskāki izmeklējumi, kuros ir jānosaka pamatsavienojums un/vai metabolīti vai jānovērtē saistīšanās ar olbaltumvielām.

Citu audu kinētika

53. Šo pētījumu mērķis ir iegūt informāciju par gaitu, lai noskaidrotu ar toksiskās iedarbības veidu, bioakumulāciju, bionoturību un tamlīdzīgiem aspektiem saistītus jautājumus, nosakot testējamās ķīmiskās vielas līmeņus dažādos audos. Audu izvēle un izvērtēto laika momentu skaits būs atkarīgi no noskaidrojamā jautājuma un testējamās ķīmiskās vielas toksikoloģiskās datubāzes. Šos papildu pētījumus par audu kinētiku plānojot, ir jāņem vērā informācija, kas ievākta saskaņā ar 37.–40. punktu. Šajos pētījumos var izmantot vienreizēju vai atkārtotu devu. Izmantotā pieeja ir detalizēti jāpamato.
54. No citu audu kinētikas pētījumu iemesliem minami šādi:
- liecības par ilgāku pussabrukšanas periodu asinīs norāda uz iespējamu testējamās ķīmiskās vielas akumulēšanos dažādos audos,
 - ir vēlme uzzināt, vai noteiktos audos ir sasniegts stacionārs līmenis (piemēram, ja atkārtotas devas pētījumos acīmredzami ir sasniegts stacionārs testējamās ķīmiskās vielas līmenis asinīs, taču ir vēlme pārliecināties, ka stacionārs līmenis ir sasniegts arī mērķaudos).

55. Šādu gaitas pētījumu ietvaros testējamās ķīmiskās vielas attiecīga orāla deva ir jāievada vismaz 4 dzīvniekiem uz katru devu katrā laikā un ir jāmonitorē vielas izplatīšanās gaita izraudzītajos audos. Ja nav novērota dzimumatkarīga toksicitāte, var izmantot tikai vienu dzimumu. Tas, vai tiks analizēta kopējā radioaktivitāte vai ķīmiskā pamatviela un/vai metabolīti, būs atkarīgs arī no noskaidrojamā jautājuma. Vielas izplatīšanās audos jānovērtē ar attiecīgiem paņēmieniem.

Enzīmu indukcija/inhibīcija

56. Pētījumi par pētījuma laikā notiekošās enzīmu indukcijas/inhibīcijas vai testējamās ķīmiskās vielas biotransformācijas sekām var būt vajadzīgi kādā vai vairākos no šādiem gadījumiem:
- 1) pieejamās liecības norāda uz sakarību starp testējamās ķīmiskās vielas biotransformāciju un pastiprinātu toksicitāti;
 - 2) pieejamie toksicitātes dati norāda uz nelineāru sakarību starp devu un metabolismu;
 - 3) metabolītu noteikšanas pētījumu rezultāti liecina, ka ir konstatēts iespējams toksisks metabolīts, kas varējis rasties testējamās ķīmiskās vielas inducētā enzīmātiskā ceļā;
 - 4) lai izskaidrotu ietekmi, ko saista ar enzīmu indukcijas fenomenu;

5) ja ar vai nu *in vitro*, vai *in vivo* eksperimentiem ar dažādām sugām vai dažādos apstākļos tiek novērotas toksikoloģiski būtiskas pārmaiņas testējamās ķīmiskās vielas metaboliskajā profilā, var būt nepieciešams raksturot iesaistīto enzīmu vai enzīmus (piemēram, tādos I fāzes enzīmus kā no citohroma P450 atkarīgas monooksidāzes sistēmas izoenzīmi, tādos II fāzes enzīmus kā sulfotransferāzes izoenzīmi vai uridīna difosfāta glikuronoziltransferāzes izoenzīmi, vai citus attiecīgus enzīmus); šo informāciju var izmantot, lai izvērtētu sugas piemērotību ekstrapolēšanai uz citām sugām.

57. Lai izvērtētu ar testējamo ķīmisko vielu saistītas pārmaiņas toksikokinētikā, jāizmanto attiecīgi pētījuma protokoli, un šie protokoli ir pienācīgi jāvaldī un jāpamato. Pētījumu paraugplānos ir paredzēta neiezīmētas testējamās ķīmiskās vielas atkārtotas devas ievadīšana, kam seko vienreizēja radioaktīvi iezīmēta deva 14. dienā, vai radioaktīvi iezīmētas testējamās ķīmiskās vielas atkārtotas devas ievadīšana un paraugu ņemšana 1., 7. un 14. dienā metabolītu profilu noteikšanai. Radioaktīvi iezīmētas testējamās ķīmiskās vielas atkārtotu devu ievadīšana var arī sniegt informāciju par bioakumulāciju (sk. 26. punktu).

PAPILDPĪEEJAS

58. Lietderīgu informāciju par to, kā dažām sugām notiek testējamās ķīmiskās vielas absorbcija, izplatīšanās, metabolisms vai izvadīšana no organisma, var sniegt papildpieejas, kas iziet ārpus šajā testēšanas metodē aprakstītajiem *in vivo* eksperimentiem.

In vitro informācijas izmantošana

59. Vairākus jautājumus, kas attiecas uz testējamās ķīmiskās vielas metabolismu, var noskaidrot *in vitro* pētījumos, kuros izmanto piemērotas testēšanas sistēmas. Lai pētītu iespējamus metabolītus, var izmantot tikko izolētus vai kultivētus hepatocītus un subcelulārās frakcijas (piemēram, mikrosomas un citosolu jeb frakciju S9) no aknām. Riska novērtēšanai var būt lietderīgi noteikt vietējo metabolismu mērķorgānā, piemēram, plaušās. Šim nolūkam var izmantot mērķaudu mikrosomālās frakcijas. Pētījumos ar mikrosomām var noteikt iespējamās atšķirības starp dzimumiem un mūža posmiem, kā arī raksturot enzīmu parametrus (K_m un V_{max}), kas var palīdzēt novērtēt metabolisma atkarību no devas kopsakarā ar ekspozīcijas līmeņiem. Turklāt mikrosomas var palīdzēt noteikt, kādi konkrēti mikrosomālie enzīmi ir iesaistīti testējamās ķīmiskās vielas metabolismā, un tas var noderēt ekstrapolēšanai uz citām sugām (sk. arī 56. punktu). Biotransformācijas inducēšanās potenciālu var arī noteikt *in vitro* pētījumos ar hepatocītu inducēšanos vai ar konkrētām šūnu līnijām, kurām notiek attiecīgo enzīmu ekspresija, izmantojot tādu dzīvnieku aknu subcelulārās frakcijas (piemēram, mikrosomas un citosolu), kuriem iepriekš ievadīta interesējošā testējamā ķīmiskā viela. Lai noteiktu, kā biotransformācija dažādām sugām var atšķirties, atsevišķos gadījumos un attiecīgos apstākļos var apsvērt cilvēka audu subcelulāro frakciju izmantošanu. *In vitro* pētījumu rezultātus var arī izmantot PBTK modeļu veidošanā (5).

60. Pētījumi par *in vitro* absorbciju ādā var sniegt papildu informāciju absorbcijas raksturošanai (6).

61. Lai noskaidrotu tādas pašas jautājumus kā attiecībā uz aknu mikrosomām, var izmantot primāro šūnu kultūras no aknu šūnām un svaīgu audu segmentus. Dažos gadījumos atbildes uz konkrētiem jautājumiem var rast, izmantojot šūnu līnijas, kurām ir izteikta attiecīgā enzīma ekspresija, vai ar inženieriju iegūtas šūnu līnijas. Dažos gadījumos var būt lietderīgi *in vitro* pētīt konkrētu citohroma P450 izozīmu (piemēram, CYP1A1, 2E1, 1A2 un citu) un/vai II fāzes enzīmu indukciju un inhibīciju, ko izraisa pamatsavienojums. Iegūto informāciju var izmantot strukturāli līdzīgiem savienojumiem.

Toksicitātes pētījumos iegūto toksikokinētikas datu izmantošana par papildinformāciju

62. Jebkādos citos toksicitātes pētījumos iegūto asins, audu un/vai ekskrēta paraugu analīze var sniegt datus par biopieejamību, to, kā koncentrācija plazmā mainās atkarībā no laika (AUC, C_{max}), bioakumulācijas potenciālu, klirensa ātrumu un metabolisma un kinētikas pārmaiņām atkarībā no dzimuma vai mūža posma.

63. Pētījuma plānu var izmantot, lai rastu atbildes uz tādiem jautājumiem kā absorbcijas piesātinājums, biotransformācijas vai ekskrēcijas ceļi augstāku devu līmeņu gadījumā, jaunu metabolisma ceļu darbība augstāku devu gadījumā un toksisko metabolītu ierobežojumi augstāko devu gadījumā.

64. No citiem apdraudējuma novērtēšanas aspektiem minami šādi:

- ar vecumu saistīta jutība, ko rada asins-smadzeņu barjeras stāvokļa, kā arī nieru atšķirības un/vai detoksicēšanas spējas atšķirības,
- subpopulācijas jutība, ko rada atšķirīga biotransformētspēja vai citas toksikokinētiskas atšķirības,
- augļa vai jaundzimušā ekspozīcijas apmērs, ja ķīmiskās vielas attiecīgi iziet caur placentu vai nonāk pienā.

Toksikokinētiskās modelēšanas izmantošana

65. Toksikokinētiskos modeļus var izmantot dažādiem apdraudējuma un riska novērtējuma aspektiem, piemēram, prognozējot sistēmisku ekspozīciju un devu, ko saņem iekšējie audi. Turklāt var aplūkot konkrētus jautājumus par iedarbības veidu, un šie modeļi var nodrošināt pamatu ekstrapolēšanai uz dažādām sugām, ekspozīcijas ceļiem un dozējuma modeļiem, kā arī cilvēka riska novērtēšanai. Dati, ko var izmantot testējamās ķīmiskās vielas PBTK modeļu izstrādei jebkurai attiecīgajai sugai, ietver 1) sadalījuma koeficientus; 2) bioķīmiskās konstantes un fizioloģiskos parametrus; 3) konkrēta ievadišanas ceļa absorbcijas parametrus; un 4) *in vivo* kinētiskos datus modeļu izvērtēšanai (piemēram, klīrensa parametri attiecībā uz attiecīgajiem ($> 10\%$) ekskrēcijas ceļiem, K_m un V_{max} attiecībā uz metabolismu). Modeļu izstrādē izmantotie eksperimentu dati ir jāiegūst ar zinātniski pamatotām metodēm, savukārt modeļu rezultāti ir jāvalidē. Lai būtu vieglāk izstrādāt beznodalījuma modeļus vai modeļus, kuru pamatā ir fizioloģija, nereti nosaka testējamai ķīmiskajai vielai un sugai raksturīgos parametrus, piemēram, absorbcijas ātrumu, sadalīšanos starp asinīm un audiem, kā arī metabolisma ātruma konstantes (7).

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

66. Pētījuma ziņojumā ir ieteicams dot satura rādītāju.

Ziņojuma pamatdaļa

67. Ziņojuma pamatdaļā ir jāsniedz šīs testēšanas metodes aptvertā informācija, kas sakārtota šādās sadaļās un punktos.

Kopsavilkums

68. Šajā pētījuma ziņojuma sadaļā jāsniedz pētījuma plāna kopsavilkums un izmantoto metožu apraksts. Tajā jāuzsver arī svarīgākie konstatējumi attiecībā uz masas bilanci, metabolītu raksturu un daudzumu, atliekām audos, klīrensa ātrumu, bioakumulācijas potenciālu, ar dzimumu saistītām atšķirībām utt. Kopsavilkumam jābūt pietiekami detalizētam, lai šos konstatējumus būtu iespējams izvērtēt.

Ievads

69. Šajā ziņojuma sadaļā jāapraksta pētījuma mērķi, pamatojums un plāns, kā arī jāsniedz attiecīgas atsaucē un jebkāda priekšvēsture.

Materiāli un metodes

70. Šajā ziņojuma sadaļā detalizēti jāsniedz visa attiecīgā informācija, tostarp:

a) testējamā ķīmiskā viela

Šajā apakšsadaļā jāidentificē testējamā ķīmiskā viela, aptverot tās ķīmisko nosaukumu, molekulāro struktūru, tās ķīmisko sastāvu kvalitatīvā un kvantitatīvā aspektā, ķīmisko tīrību un, ja iespējams, jebkādu piemaisījumu veidu un daudzumus. Jāietver arī informācija par fizikālajām/ķīmiskajām īpašībām, arī par agregātstāvokli, krāsu, izteiktu šķīdību un/vai sadalījuma koeficientu, stabilitāti un attiecīgā gadījumā kodīgumu. Attiecīgā gadījumā jāsniedz informācija par izomēriem. Ja testējamā ķīmiskā viela ir radioaktīvi iezīmēta, šajā apakšsadaļā jāietver informācija par radionuklīda veidu, iezīmēto vietu, konkrēto iedarbību un radioķīmisko tīrību.

Jānorāda, kāda veida nesējvielas, atšķaidītāji, suspendējoši preparāti un emulgatori vai citi materiāli izmantoti testējamās ķīmiskās vielas ievadīšanā, vai tie jāapraksta.

b) testa dzīvnieki

Šajā apakšsadaļā jāsniedz informācija par testa dzīvniekiem, arī par sugu, līnijas un vecuma izvēli un pamatojumu pētījuma sākumā, kā arī par dzimumu, ķermeņa svaru, veselības stāvokli un dzīvnieku turēšanu.

c) metodes

Šajā apakšsadaļā jāietver sīka informācija par pētījuma plānu un izmantoto metodiku. Jāapraksta:

- 1) attiecīgā gadījumā jebkādas ekspozīcijas ceļa un apstākļu maiņas pamatojums;

- 2) izraudzīto devu līmeņu pamatojums;
 - 3) ja vajadzīgs, ievadpētījumi, kas izmantoti turpmāko pētījumu eksperimentu plānošanai; jāsniedz ievadpētījumu pamatojošie dati;
 - 4) kā tika sagatavots devu šķīdums un kāds šķīdinātājs vai nesējviela tika izmantoti (ja tie izmantoti);
 - 5) apstrādes grupu skaits un dzīvnieku skaits grupās;
 - 6) devu līmeņi un tilpums (un devas konkrētā iedarbība, ja tika izmantota radioaktivitāte);
 - 7) ievadišanas ceļš vai ceļi un metodes;
 - 8) devu ievadišanas biežums;
 - 9) nebarošanas periods (ja tas izmantots);
 - 10) kopējā radioaktivitāte katram dzīvniekam;
 - 11) rīkošanās ar dzīvniekiem;
 - 12) paraugu ņemšana un apstrāde;
 - 13) analītiskās metodes, kas izmantotas metabolītu atdalīšanai, kvantificēšanai un identificēšanai;
 - 14) ar izmantotajām metodēm saistītā noteikšanas robeža;
 - 15) citi eksperimentu mērījumi un izmantotās procedūras (arī metabolītu analīzes metožu validēšana).
- d) statistiskā analīze

Ja pētījuma konstatējumu analizēšanai tika izmantota statistiskā analīze, jāsniedz pietiekami plaša informācija par izmantoto analīzes metodi un datorprogrammu, lai neatkarīgs recenzents/statistiķis analīzi varētu atkārtoti izvērtēt un rekonstruēt.

Sistēmu modelēšanas pētījumu, piemēram, *PBTK*, gadījumā modeļu raksturojumā jāietver tāds pilnīgs modeļa apraksts, pēc kura to iespējams neatkarīgi rekonstruēt un validēt (sk. 65. punktu un papildinājumu "Definīcijas").

Rezultāti

71. Visi dati jāapkopo tabulā ar attiecīgu statistisko izvērtējumu, kā arī jāapraksta šajā sadaļā. Radioaktivitātes skaitīšanas dati ir jāapkopo un jāizklāsta atbilstoši pētījuma vajadzībām, parasti mikrogramos vai miligramā ekvivalentos uz parauga svaru, lai gan var izmantot arī citas vienības. Šajā sadaļā ir jāietver konstatējumu grafiski attēlojumi, reprezentatīvu hromatogrāfisko un spektrometrisko datu atveids, dati par metabolītu identificēšanu/kvantificēšanu un hipotētiskajiem metabolisma ceļiem, arī par metabolītu molekulāro struktūru. Papildus attiecīgā gadījumā šajā sadaļā jāietver šāda informācija:
1. Radioaktivitātes kvantitatīvā un procentuālā atgūstamība ar urīnu, ekskrementiem, izelpoto gaisu un būra mazgājamo ūdeni, kas satur urīnu un ekskrementus.
 - Ārīgas aplikācijas pētījumos jāsniedz arī dati par testējamās ķīmiskās vielas atgūstamību ar apstrādātu ādu, ādas nomazgājumiem un par atlikušo radioaktivitāti ādas apstrādāšanas ierīcē un metabolisma kamerā, kā arī ādas mazgāšanas pētījuma rezultāti. Jautājums tālāk aplūkots 74.–77. punktā.
 - Inhalācijas pētījumos jāsniedz arī dati par testējamās ķīmiskās vielas atgūstamību no plaušām un deguna audiem (8). Jautājums tālāk aplūkots 78. punktā.

2. Vietas izplatīšanās audos, kuru raksturo ar ievadītās devas un koncentrācijas procentuālo īpatsvaru (mikrogramos uz 1 gramu audu), kā arī ar attiecību starp saturu audos un asinīs vai audos un plazmā.
3. Materiālu balance, kas iegūta katrā pētījumā, kurā analizē ķermeņa audus un ekskretu.
4. Koncentrācija plazmā un toksikokinētiskie parametri (biopieejamība, AUC , C_{max} , T_{max} , klīrenss, pussabrukšanas periods) pēc ievadīšanas pa attiecīgo ekspozīcijas ceļu vai ceļiem.
5. Testējamās ķīmiskās vielas absorbcijas ātrums un apmērs pēc ievadīšanas pa attiecīgo ekspozīcijas ceļu vai ceļiem.
6. Ekskrētā ievāktā testējamās ķīmiskās vielas un metabolītu daudzumi (kā procentuālais īpatsvars no ievadītās devas).
7. Atsauces uz papildinājuma datiem, tostarp atsevišķu dzīvnieku datiem par visiem mērīšanas beigupunktiem (piemēram, devu ievadīšanu, procentuālo atgūstamību, koncentrācijām).
8. Attēls ar hipotētiskajiem metabolisma ceļiem un metabolītu molekulāro struktūru.

Iztirzājums un secinājumi

72. Šajā sadaļā autoriem:

- 1) jānorāda hipotētiskais metabolisma ceļš, pamatojoties uz testējamās ķīmiskās vielas metabolisma un izdalīšanās rezultātiem;
- 2) jāapspriež visas iespējamās sugu un dzimumu atšķirības attiecībā uz testējamās ķīmiskās vielas izdalīšanos un/vai biotransformāciju;
- 3) jāizveido tabulas un jāapspriež metabolītu noteikšana un daudzums, klīrensa ātrums, bioakumulācijas potenciāls, kā arī pamatvielas un/vai metabolīta(-u) atlieku līmenis audos un attiecīgā gadījumā iespējamās no devas atkarīgās toksikokinētisko parametru maiņas;
- 4) jāiestrādā visi būtiskie toksikokinētikas dati, kas iegūti toksicitātes pētījumu gaitā;
- 5) jāsniedz īsi secinājumi, ko var pamatot ar pētījuma konstatējumiem;
- 6) attiecīgā gadījumā jāpievieno jaunas sadaļas.

73. Papildu sadaļas jāizmanto, lai sniegtu pamatojošu bibliogrāfisku informāciju, tabulas, attēlus, pielikumus utt.

ALTERNATĪVI EKSPOZĪCIJAS CEĻI

Ārīga aplikācija

Ādas apstrādāšana

74. Šajā sadaļā ir sniegta konkrēta informācija par testējamās ķīmiskās vielas toksikokinētikas pētīšanu ar ārīgu aplikāciju. Attiecībā uz absorbciju ādā ir jāizmanto šā pielikuma B.44. nodaļa "Absorbējamā ādā: *in vivo* metode" (9). Attiecībā uz citiem beigupunktiem, piemēram, izplatīšanos un metabolismu, jāizmanto šī B.36. testēšanas metode. Ādas apstrādāšanā ir jāizmanto viens vai vairāki testējamās ķīmiskās vielas devu līmeņi. Testējamai ķīmiskajai vielai (piemēram, tīram, atšķaidītam vai salikta sastāva materiālam, kas satur testējamo ķīmisko vielu, kura tiek aplicēta uz ādas) jābūt tai pašai (vai reālistiskam surogātam), kuras iedarbībai var tikt pakļauts cilvēks vai, iespējams, citas mērķsugas. Devu līmenis(-ņi) ir jāizvēlas saskaņā ar šīs testēšanas metodes 20.–26. punktu. No faktoriem, kurus varētu ņemt vērā ārīgās aplikācijas devu izvēlē, minama gaidāmā cilvēka ekspozīcija un/vai devas, kuru gadījumā toksicitāte tikusi novērota citos ārīgās aplikācijas toksicitātes pētījumos. Ārīgās aplikācijas deva(-as), ja vajadzīgs, ir jāizšķīdina piemērotā nesējvielā un jāaplicē tādā tilpumā, ar kuru pietiek, lai deva tiktu saņemta. Neilgi pirms testēšanas ir jānocērp apmatojums uz testa dzīvnieku muguras. Ādu var arī noskūt, bet tas jā dara aptuveni 24 stundas pirms testa. Cērpot vai skujot apmatojumu, jāuzmanās, lai nenobrāztu ādu, jo tas

varētu mainīt ādas caurlaidību. Lai aplicētu testējamo ķīmisko vielu, no apmatojuma jāatbrīvo aptuveni 10 % ķermeņa virsmas. Ja ķīmiskās vielas ir ļoti toksiskas, apstrādājamā ādas virsma var būt mazāka par 10 %, bet iespējami lielāka daļa šīs virsmas ir jānoklāj plānā un vienmērīgā kārtā. Visām ārīgās aplikācijas testa grupām jāizmanto vienāda lieluma apstrādes virsmas. Ar devu apstrādātās virsmas ir jāaizsargā ar piemērotu pārklāju, kas nostiprināts. Dzīvnieki ir jātur atsevišķi cits no cita.

75. Lai novērtētu, cik daudz testējamās ķīmiskās vielas aplicētās devas ar maigām ziepēm un ūdeni var nomazgāt no apstrādātās ādas zonas, jāizdara ādas mazgāšanas pētījums. Šis pētījums var arī palīdzēt testējamās ķīmiskās vielas ārīgā aplicēšanā noteikt masas bilanci. Šajā ādas mazgāšanas pētījumā diviem dzīvniekiem aplicē vienreizēju testējamās ķīmiskās vielas devu. Devas līmeni izvēlas saskaņā ar šīs testēšanas metodes 23. punktu (attiecībā uz dermālā kontakta ilgumu sk. 76. punktu). Ir jānosaka ar mazgāšanu atgūtie testējamās ķīmiskās vielas daudzumi, lai novērtētu testējamās ķīmiskās vielas nomazgāšanas rezultativitāti.
76. Ja vien to neliedz kodīgums, testējamā ķīmiskā viela ir jāaplicē un uz ādas jātur vismaz sešas stundas. Pārklāju noņemot, apstrādātā zona ir jānomazgā saskaņā ar procedūru, kas norādīta ādas mazgāšanas pētījumam (sk. 75. punktu). Gan pārklājs, gan mazgāšanas ūdens ir jāanalizē, nosakot, cik tajos palicis testējamās ķīmiskās vielas. Pēc pētījumu pabeigšanas visi dzīvnieki ir humāni jānonāvē saskaņā ar (2) un apstrādātā āda ir jānoņem. Piemērots apstrādātās ādas fragments jāanalizē, lai noteiktu, cik testējamās ķīmiskās vielas (radioaktivitātes) palicis ādā.
77. Farmaceitisko preparātu toksikokinētikas novērtēšanā var būt vajadzīgas citādas procedūras, kas atkarīgas no regulatīvās sistēmas.

Inhalācija

78. Jāizmanto viena testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija (vai vairākas, ja vajadzīgs). Koncentrācija(-as) ir jāizvēlas saskaņā ar šīs testēšanas metodes 20.–26. punktu. Inhalatīvā apstrāde jāveic, izmantojot tikai deguna vai tikai galvas ekspozīcijas aparātus, lai novērstu absorbēšanos pa citiem ekspozīcijas ceļiem (8). Ja tiek izmantoti citādi inhalācijas ekspozīcijas apstākļi, ziņojumā šī atkāpe jāpamato. Jāparedz noteikts inhalācijas ekspozīcijas ilgums; parasti tas ir 4–6 stundas.

LITERATŪRA

- (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 N°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) Šā pielikuma B.45. nodaļa "Absorbēšana ādā: *in vitro* metode".
- (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) Šā pielikuma B.44. nodaļa "Absorbēšana: *in vivo* metode".
- (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.
-

Papildinājums

DEFINĪCIJAS

Absorbcija: process vai procesi, kuros audi uzņem ķīmiskās vielas vai tās nodod tālāk citiem audiem. Par absorbciju runā attiecībā uz pamatsavienojumu un visiem tā metabolītiem. Nejaukt ar "biopieejamību".

Akumulācija (bioakumulācija): testējamās ķīmiskās vielas daudzuma palielināšanās laika gaitā audos (parasti taukaudos pēc atkārtotas ekspozīcijas). Ja testējamā ķīmiskā viela organismā nonāk straujāk, nekā no tā tiek izvadīta, organisms testējamo ķīmisko vielu akumulē un var iestāties testējamās ķīmiskās vielas toksiska koncentrācija.

ADME: akronīms, kas nozīmē "absorbcija, izplatīšanās, metabolisms un ekskrēcija".

AUC: (apgabals zem līknes, kas raksturo, kā koncentrācija plazmā ir atkarīga no laika): apgabals zem līknes grafiski attēlo testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju plazmā kā laika funkciju. Tas atspoguļo ķermeņa kopējo absorbēto testējamās ķīmiskās vielas daudzumu iepriekš noteiktā laika periodā. Lineāros apstākļos AUC (laikā no nulles līdz bezgalībai) ir proporcionāls kopējam testējamās ķīmiskās vielas daudzumam, ko organisms absorbējis neatkarīgi no absorbcijas ātruma.

Autoradiogrāfija (visa ķermeņa autoradiogrāfija): paņēmieni, ar ko kvalitatīvi un/vai kvantitatīvi noteic radioaktīvas testējamās ķīmiskās vielas lokalizāciju audos, šajā nolūkā reģistrējot izmeklētajā objektā emitēto radiāciju, lai ar rentgenfilmās vai (pēdējā laikā) digitālās fosforattēlveides palīdzību vizualizētu radioaktīvi iezīmētas molekulas vai molekulu fragmentus. Visa ķermeņa kvantitatīvajai autoradiogrāfijai salīdzinājumā ar orgānu secēšanu var būt dažas priekšrocības, izvērtējot testējamās ķīmiskās vielas izplatīšanos un novērtējot radioaktīvā materiāla kopējo atgūstamību un izšķiramību audos. Piemēram, viena būtiska priekšrocība ir tāda, ka to var izmantot, lai pigmentētā dzīvniekmodelī novērtētu testējamās ķīmiskās vielas iespējamo saistību ar melanīnu, kas var piesaistīt noteiktas molekulas. Tomēr ar šo paņēmieni var gan iegūt ērtus visa ķermeņa kopskatus attiecībā uz augstas kapacitātes un zemas afinitātes saistvielām, taču tikai ierobežoti atpazīt receptoru saistvielas un tamlīdzīgas konkrētas mērķvielas, kuru konstatēšanai ir vajadzīga samērā augsta izšķirtspēja un augsts jutīgums. Ja tiek izmantota autoradiogrāfija, eksperimenti, kuros nosaka ievadītā savienojuma masas bilanci, jāveic ar atsevišķu grupu vai atsevišķi no eksperimenta, kurā pēta vielas izplatīšanos audos, homogenizējot un ar šķidruma scintilāciju skaitīšanu analizējot visu ekskretu (kas var ietvert arī izelpoto gaisu) un visus liķus.

Žults ekskrēcija: ekskrēcija pa žultsceļiem.

Bioakumulācija: sk. "Akumulācija".

Biopieejamība: ievadītās devas daļa, kas nonāk lielajā asinsrites lokā vai kļūst pieejama fizioloģiskās aktivitātes vietā. Parasti par testējamās ķīmiskās vielas biopieejamību runā attiecībā uz pamatsavienojumu, taču šo jēdzienu var attiecināt arī uz tās metabolītu. Tas attiecas tikai uz vienu ķīmisko formu. *Nota bene:* biopieejamība un absorbcija nav viens un tas pats. Atšķirību, piemēram, starp orālu absorbciju (t. i., klātbūtni zarnu sienā un vārtu vēnas sistēmas asinsritē) un biopieejamību (t. i., klātbūtni lielajā asinsrites lokā un audos) cita starpā var radīt ķīmiskā noārdē zarnu sienu metabolisma dēļ, atpakaļizplūde uz zarnu lūmenu vai pirmssistēmas metabolisms aknās (10). Toksiskā komponenta (pamatsavienojuma vai metabolīta) biopieejamība ir ļoti svarīgs parametrs cilvēka riska novērtēšanā (ekstrapolēšanā no augstas devas uz zemu, no viena ceļa uz citu), jo dod iespēju no ārējā NOAEL vai BMD (ievadītās devas) atvedināt iekšējo vērtību. Lai orālas ievadīšanas gadījumā noskaidrotu iedarbību uz aknām, pietiek ar orālu absorbciju. Tomēr attiecībā uz jebkuru citu iedarbību, kas nav ievadīšanas vietā, parasti tieši biopieejamība, nevis absorbcija ir drošāks parametrs turpmākai izmantošanai riska novērtēšanā.

Bioloģiskā noturība: sk. "Noturība".

Biotransformācija: organismā notiekoša interesējošās testējamās ķīmiskās vielas ķīmiska (parasti enzimatiska) pārvēršanās par citu ķīmisko vielu. Sinonīms "metabolismam".

C_{max}: maksimālā pēcievadīšanas koncentrācija asinīs (plazmā/serumā) vai maksimālā pēcievadīšanas ekskrēcija (urīnā vai ekskrementos).

Klīrensa ātrums: kvantitatīvi izteikts ātrums, kādā testējama ķīmiskā viela tiek izvadīta no asinīm, plazmas vai noteiktiem audiem (daudzums laika vienībā).

Nodalījums: ķermeņa, audu vai šūnas strukturāla vai bioķīmiska daļa (vai vienība), kas ir nodalīta no pārējās daļas.

Detoksikācijas ceļi: to cita citai sekojošu norišu virknes, kuru gaitā toksiskas ķīmiskas vielas ar metaboliskām pārmaiņām vai ekskrēciju izzūd no organisma.

Izplatīšanās: testējamās ķīmiskās vielas un tās atvasinājumu izkliedēšanās pa ķermeni.

Enzīmi/izozīmi: olbaltumvielas, kas katalizē ķīmiskas reakcijas. Izozīmi ir enzīmi, kas katalizē vienas un tās pašas ķīmiskas reakcijas, bet atšķiras pēc aminoskābju virknes to molekulā.

Enzimātiskie parametri: K_m – Mihaelisa (*Michaelis*) konstante; V_{max} – maksimālais ātrums.

Ekskrēcija: process vai procesi, kuros organismā ievadītā testējamā ķīmiskā viela un/vai tās metabolīti tiek no ķermeņa izvadīti.

Eksogēns: organismā vai sistēmā no ārienes ievadīts vai ārpus tiem ģenerēts.

Ekstrapolācija: vienas vai vairāku nezināmu vērtību izsecināšana no tā, kas ir zināms vai novērots.

Pussabrukšanas periods ($t_{1/2}$): laiks, kas pāriet, līdz testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija nodalījumā samazinās uz pusi. Parasti par to runā attiecībā uz koncentrāciju plazmā vai uz testējamās ķīmiskās vielas daudzumu visā ķermenī.

Indukcija / enzīmu indukcija: enzīmu sintezēšanās kā atbilde uz vides stimulu vai inducētājmolekulu.

Linearitāte / lineārā kinētika: process ir kinētiski lineārs, ja visi pārneses ātrumi starp nodalījumiem ir proporcionāli klātesošajiem daudzumiem vai koncentrācijām, t. i., pirmēji. Tādējādi klirensa ātrums un izplatīšanās tilpums, tāpat kā pussabrukšanas periodi, ir nemainīgi. Sasniegtās koncentrācijas ir proporcionālas devas došanas intensitātei (eksponēcijai), un ir vieglāk prognozēt akumulāciju. Linearitāti/nelinearitāti var novērtēt, attiecīgos parametrus, piemēram, AUC, salīdzinot pēc dažādām devām vai arī pēc vienreizējas un atkārtotas eksponēcijas. Tas, ka nav atkarības no devām, var norādīt uz savienojuma metabolismā iesaistīto enzīmu piesātinājumu, savukārt tas, ka AUC pēc atkārtotas eksponēcijas ir lielāks nekā pēc vienreizējas eksponēcijas, var norādīt uz metabolisma inhibēšanu, bet tas, ka AUC pēc atkārtotas eksponēcijas ir mazāks, var norādīt uz metabolisma inducēšanu (sk. arī (11)).

Masas bilance: tas, cik testējamās ķīmiskās vielas tiek ievadīts sistēmā un cik no tās izvadīts.

Materiālā bilance: sk. "Masas bilance".

Toksicitātes mehānisms (veids) / iedarbības mehānisms (veids): par iedarbības mehānismu runā attiecībā uz konkrētu bioķīmisku mijiedarbību, ar kuras starpniecību testējamā ķīmiskā viela iedarbojas. Par iedarbības veidu runā attiecībā uz vispārīgākiem ceļiem, kuri noved pie testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes.

Metabolisms: sinonīms "biotransformācijai".

Metabolīti: metabolisma vai metabolisku procesu produkti.

Orāla absorbcija: testējamās ķīmiskās vielas devas procentuālā daļa, kas tiek absorbēta no ievadīšanas vietas (t. i., kuņģa un zarnu trakta). Šo svarīgo parametru var izmantot, lai noskaidrotu, kāda ievadītās testējamās ķīmiskās vielas daļa nonāk vērtu vēnā un pēc tam aknās.

Sadalījuma koeficients: skaitliski izteikta ķīmiskās vielas diferenciālā šķīdība divos šķīdinātājos; saukts arī par sadalīšanās koeficientu.

Maksimālie līmeņi asinīs (plazmā/serumā): maksimālā koncentrācija (maksimumkoncentrācija) asinīs (plazmā/serumā) pēc ievadīšanas (sk. arī " C_{max} ").

Noturība (bioloģiskā noturība): ķīmiskas vielas ilgstoša klātbūtne (bioloģiskā sistēmā) sakarā ar izturību pret noārdīšanu/izvadīšanu no organisma.

Analoģijas princips: izmantojot informāciju par vienas vai vairāku ķīmisko vielu testēšanas beigupunktiem, prognozē ķīmiskās mērķvielas testēšanas beigupunktu.

Receptoru mikroskopiskā autoradiogrāfija (jeb receptoru mikroautoradiogrāfija): šo paņēmieni var izmantot, pētot ksenobiotisko mijiedarbību ar specifiskām vietām audos vai specifiskām šūnu populācijām, piemēram, veicot tādas pētījumus par receptoru saistītajām vai specifiskiem to darbības veidiem, kuros var būt vajadzīga augsta izšķirtspēja un augsts jutīgums, ko citi paņēmieni, piemēram, visa ķermeņa autoradiogrāfija, var nenodrošināt.

Ievadīšanas ceļš (orāls, intravenozs, dermāls jeb ar āriņu aplikāciju, inhalatīvs utt.): attiecas uz to, kādā veidā ķīmiskās vielas ievada organismā (piemēram, orāli ar zondi; orāli ar uzturu; ar āriņu aplikāciju; ar inhalāciju; intravenozi utt.)

Piesātinājums: stāvoklis, kurā viens vai vairāki kinētiskie procesi (piemēram, absorbcija, metabolisms vai klīrenss) ir maksimālā līmenī (proti, "piesātināti").

Jutība: metodes vai instrumenta spēja atšķirt mērreakcijas, kas atspoguļo dažādus interesējošā mainīgā lieluma līmeņus.

Stacionārs līmenis asinīs (plazmā): nelīdzsvarots atvērtas sistēmas stāvoklis, kurā visus spēkus, kas uz sistēmu iedarbojas, precīzi kompensē pretēji spēki, tā ka visu tās komponentu koncentrācija ir stacionāra, lai gan caur sistēmu plūst viela.

Sistēmu modeļošana (toksikokinētiski fizioloģiska, farmakokinētiska, farmakokinētiski fizioloģiska, bioloģiska utt.): abstrakti modeļi, kuros sistēmas izturēšanos apraksta matemātiskā valodā.

Mērķaudi: audi, kuros izpaužas toksiskas vielas svarīgākā nelabvēlīgā ietekme.

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda ķīmiska viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Izplatīšanās audos: testējamās ķīmiskās vielas apgriezeniska pārvietošanās no vienas vietas organismā uz citu. Vielas izplatīšanos audos var pētīt ar orgānu secēšanu, homogenizāciju, sadedzināšanu un šķidruma scintilāciju skaitīšanu vai ar kvalitatīvu un/vai kvantitatīvu visa ķermeņa autoradiogrāfiju. Pirmie no minētajiem paņēmieniem var noderēt, lai koncentrācijas ziņā un procentuāli noskaidrotu atgūstamību no to pašu dzīvnieku audiem un liķa pārējās daļas, taču tiem var pietrūkt izšķirtspējas attiecībā uz visiem audiem un ar tiem nevar panākt ideāli pietiekamu kopējo atgūstamību (< 90 %). Attiecībā uz autoradiogrāfiju sk. definīciju iepriekš.

T_{max}: laiks, kurā sasniedz C_{max}.

Toksikokinētika (farmakokinētika): pēta ķīmisko vielu absorbciju, izplatīšanos, metabolismu un ekskrēciju laika gaitā.

Modeļu validēšana: process, kurā novērtē, vai modelis ir pietiekams pieejamo toksikokinētikas datu konsekvantai aprakstīšanai. Modeļus var izvērtēt, modeļu prognozes statistiski un vizuāli salīdzinot ar eksperimentālām vērtībām attiecībā pret kopīgu neatkarīgu mainīgo (piemēram, laiku). Izvērtēšanas pakāpe jāpamato attiecībā uz paredzēto modeļa izmantošanu."

8) pievieno B.52. nodaļu:

"B.52. AKŪTĀ INHALĀCIJAS TOKSICITĀTE: AKŪTĀS TOKSICITĀTES KLASĒS METODE

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem 436 (TG) (2009. gads). Pirmos TG 403 par akūto inhalācijas toksicitāti pieņēma 1981. gadā. Kopš tā laika tie ir pārskatīti (sk. šā pielikuma B.2. nodaļu (1)). Inhalācijas akūtās toksicitātes klases (ATC) metodes (2) (3) (4) izstrādi uzskatīja par nepieciešamu pēc tam, kad tika pieņemta pārskatītā orālās ATC metode (šā pielikuma B.1.c nodaļa) (5). Retrospektīvi pēc veikspējas novērtējot šo metodi, tika atzīts, ka šī metode ir piemērota izmantošanai klasificēšanas un marķēšanas nolūkos (6). Inhalācijas ATC testēšanas metode dos iespēju ranžēt testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti, izmantojot vairākas pakāpeniski pieaugošas mērķkoncentrācijas. Mirstību izmanto par svarīgāko beigupunktu, tomēr dzīvnieki, kas cieš smagas sāpes vai mokas vai kas acīmredzami nobeigsies, ir humāni jānonāvē, lai mazinātu ciešanas. Norādījumi par humāniem beigupunktiem pieejami ESAO Norādījumu dokumentā Nr. 19 (7).
2. Norādījumi par šīs testēšanas metodes īstenošanu un interpretēšanu ir pieejami *Guidance Document No. 39 on Acute Inhalation Toxicity Testing* (GD 39) (8).
3. Šīs testēšanas metodes kontekstā izmantotās definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā un GD 39 (8).
4. Šī testēšanas metode sniedz informāciju par testējamās ķīmiskās vielas bīstamajām īpašībām un ļauj šo vielu ranžēt un klasificēt saskaņā ar Regulu (EK) Nr. 1272/2008 attiecībā uz ķīmisko vielu, kuras rada akūtu toksicitāti, klasifikāciju (9). Ja ir vajadzīgas LC₅₀ vērtību punktu aplēses vai koncentrācijas un atbildes reakcijas sakarības analīze, jāizmanto šā pielikuma B.2. nodaļas testēšanas metode (1). Papildu norādījumi par testēšanas metodes izvēli ir pieejami GD 39 (8). Šī testēšanas metode nav paredzēta tieši specializētu materiālu, piemēram, mazšķīstošu izometrisku materiālu vai šķiedrmateriālu, vai rūpnieciski ražotu nanomateriālu, testēšanai.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

5. Lai līdz minimumam samazinātu dzīvnieku izmantošanu testos, testēšanas laboratorijai, pirms tā apsver, vai testēšanu neveikt saskaņā ar šo metodi, ir jāizskata visa pieejamā informācija par testējamo ķīmisko vielu, arī līdzšinējie pētījumi, kuru dati palīdzētu izvairīties no papildu testēšanas. Informācija, kas varētu palīdzēt piemērotāko sugu, līniju, dzimuma, ekspozīcijas režīma un attiecīgu testējamo koncentrāciju noteikšanā, ietver testējamās ķīmiskās vielas identitāti, ķīmisko struktūru un fizikālķīmiskās īpašības; jebkādu *in vitro* vai *in vivo* toksicitātes testu rezultātus; paredzēto(-os) izmantojumu(-us) un iespējamo cilvēka ekspozīciju; pieejamos (Q)SAR datus un toksikoloģiskos datus par strukturāli radniecīgām ķīmiskām vielām. Ar šo testēšanas metodi nedrīkstētu testēt koncentrācijas, kuru kodīgā ⁽¹⁾ vai stipri kairinošā iedarbība var radīt stipras sāpes un/vai ciešanas (sk. GD 39 (8)).

TESTA PRINCIPS

6. Testa princips ir tāds, ka četras stundas ilgā ekspozīcijā vairākpakāpju procedūrā iegūst testējamās ķīmiskās vielas klasificēšanai pietiekamu informāciju par šīs vielas akūto inhalācijas toksicitāti. Konkrētām regulatīvām vajadzībām var izmantot citus ekspozīcijas ilgumus. Katrai noteiktajai koncentrācijas pakāpei izmanto trīs katra dzimuma dzīvniekus. Atkarībā no dzīvnieku mirstības (nāve un/vai pirmsnāves stāvoklis) testējamās ķīmiskās vielas akūtās toksicitātes noteikšanai var pietikt ar divām pakāpēm. Ja ir pieejamas liecības, ka kāds no dzimumiem ir uzņēmīgāks, testu var turpināt tikai ar uzņēmīgāko dzimumu. Iepriekšējās pakāpes rezultāts noteiks nākamā pakāpi, proti:
 - a) vai nu turpmāki testi nav vajadzīgi;
 - b) vai jāveic tests ar trijiem katra dzimuma dzīvniekiem; vai
 - c) jāveic tests ar sešiem uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekiem, t. i., toksicitātes klases zemākās robežas aplēšu pamatā jābūt sešiem dzīvniekiem katrā testa koncentrācijas grupā neatkarīgi no dzimuma.
7. Mirstoši dzīvnieki, kā arī dzīvnieki, kas acīmredzami cieš sāpes vai pārdzīvo stipras un ilgstošas ciešanas, ir humāni jānonāvē, un, interpretējot testa rezultātus, tie jāuzlūko tāpat kā testā nobeigušies dzīvnieki. Kritēriji, pēc kuriem pieņem lēmumu nonāvēt mirstošus dzīvniekus un dzīvniekus, kam ir smagas ciešanas, kā arī norādījumi par paredzamu vai neizbēgamu nobeigšanos ir sniegti *Guidance Document No. 19 on Humane Endpoints* (7).

METODES APRAKSTS

Dzīvnieku sugas izvēle

8. Ir jāizmanto jauni un veseli pieauguši dzīvnieki, kas pieder pie laboratorijās parasti izmantotajām līnijām. Ieteicamā suga ir žurka. Ja izmanto citas sugas, tas jāpamato.

Dzīvnieku sagatavošana

9. Mātes nedrīkst būt iepriekš dzemdējušas vai grūsnas. Ekspozīcijas dienā dzīvniekiem jābūt jauniem pieaugušiem (8–12 nedēļas) veciem dzīvniekiem ar ķermeņa svaru, kas nepārsniedz $\pm 20\%$ no jebkādu iedarbībai iepriekš pakļautu tāda paša vecuma abu dzimumu dzīvnieku vidējā ķermeņa svara. Dzīvniekus izvēlas pēc nejaušības principa un marķē individuālai identificēšanai. Dzīvniekus līdz testa sākumam vismaz piecas dienas tur būros, lai tie aklimatizētos laboratorijas apstākļos. Dzīvnieki uz īsu laiku pirms testa sākšanas ir jāaklimatizē arī attiecībā uz testa aprikojumu, jo tas mazinās jaunās vides radīto stresu.

Dzīvnieku turēšana

10. Temperatūrai eksperimenta dzīvnieku turēšanas telpā jābūt $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Relatīvo mitrumu vēlamā uzturēt 30–70 % diapazonā, lai gan tas var būt neiespējami, ja par nesējvielu izmanto ūdeni. Pirms un pēc ekspozīcijām dzīvnieki parasti ir jātur būros grupās pēc dzimuma un koncentrācijas, bet dzīvnieku skaits būrī nedrīkst traucēt katra dzīvnieka novērošanu, kā arī dzīvnieku skaitam jābūt tādam, lai iespējami mazāki būtu zudumi kanibālisma un kaušanās dēļ. Ja tiek izmantota vienīgi dzīvnieku deguna ekspozīcija, var būt vajadzīgs dzīvniekus aklimatizēt fiksācijas caurulēm. Fiksācijas caurules nedrīkst dzīvniekiem radīt nevajadzīgu fizisku, termisku vai ar imobilizāciju saistītu stresu. Fiksācija var ietekmēt fizioloģiskos beigupunktus, piemēram, ķermeņa temperatūru (hipertermija) un/vai plaušu minūtes tilpumu. Ja ir pieejami vispārīgi dati, kas apliecina, ka nekādas šādas pārmaiņas nerodas vērā ņemamā apmērā, iepriekšēja pielāgošanās fiksācijas caurulēm nav vajadzīga. Ja tiek izmantota visa ķermeņa ekspozīcija aerosolam, dzīvnieki ekspozīcijas laikā ir jātur atsevišķi, lai tie nevarētu uzņemt testējamo

⁽¹⁾ Kodīguma novērtējuma pamatā varētu būt ekspertu atzinums, kurā izmantotas tādas liecības kā cilvēku un dzīvnieku pieredze, pieejamie (*in vitro*) dati, piemēram, šā pielikuma B.40. nodaļa (10) un B.40.a nodaļa (11) vai ESAO TG 435 (12), pH vērtības, informācija par citām, līdzīgām ķīmiskajām vielām vai jebkādi citi būtiski dati.

aerosolu no citu būra dzīvnieku apmatojuma. Izņemot ekspozīcijas laiku, var izmantot tradicionālu un sertificētu laboratorijas uzturu, ko papildina ar neierobežotu daudzumu krāna dzeramā ūdens. Dzīvniekus 12 stundas diennaktī tur mākslīgā apgaismojumā, bet 12 stundas – tumsā.

Inhalācijas kameras

11. Izvēloties inhalācijas kameru, jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas īpašības un testa mērķis. Visieteicamākā metode ir dzīvnieka deguna ekspozīcija (šis termins aptver dzīvnieka galvas, deguna vai snuķa ekspozīciju). Dzīvnieka deguna ekspozīcija ir parasti ieteicama šķidro vai cieto aerosolu pētījumiem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Pētījuma konkrētos mērķus, iespējams, var labāk sasniegt, izmantojot visa ķermeņa ekspozīciju, bet tas ir jāpamato pētījuma ziņojumā. Lai nodrošinātu atmosfēras stabilitāti, izmantojot visa ķermeņa kameru, testa dzīvnieku kopējais apjoms nedrīkst pārsniegt 5 % no kameras tilpuma. Deguna un visa ķermeņa ekspozīcijas paņēmieni principi un to konkrētās priekšrocības un trūkumi ir aprakstīti GD 39 (8).

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻI

Koncentrāciju ievadīšana

12. Ekspozīcijai ieteicams izvēlēties nemainīgu četru stundu ilgumu, izņemot līdzsvara sasniegšanas laiku. Var būt vajadzīgi citi ilgumi, lai nodrošinātu atbilstību konkrētām prasībām, tomēr pētījuma ziņojumā tas jāpamato (sk. GD 39 (8)). Dzīvnieki, kas iedarbībai tiek pakļauti visa ķermeņa kamerās, ir jātur atsevišķi, lai nepieļautu, ka testējamā ķīmiskā viela tiek uzņemta, laizot citus būra dzīvniekus. Ekspozīcijas periodā dzīvniekus nevajadzētu barot. Visa ķermeņa ekspozīcijas laikā var pastāvīgi nodrošināt ar ūdeni.
13. Dzīvnieki tiek pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai gāzes, tvaiku, aerosola vai to sajaukuma veidā. Testējamais agregātvoklis ir atkarīgs no testējamās ķīmiskās vielas fizikālķīmiskajām īpašībām, izraudzītās koncentrācijas un/vai fizikālās formas, kas testējamās ķīmiskās vielas apstrādes un izmantošanas laikā ir visvarbūtīgākā. Higroskopiskas un ķīmiski reaģējošas testējamās ķīmiskās vielas ir jātestē sausa gaisa apstākļos. Jāraugās, lai nerastos sprādzienbīstamas koncentrācijas.

Daļiņu sadalījums pēc lieluma

14. Daļiņu sadalījums pēc lieluma jānoteic visiem aerosoliem un tvaikiem, kas var kondensēties un veidot aerosolu. Lai nodrošinātu visu elpošanas sistēmas attiecīgo rajonu ekspozīciju, ir ieteicami aerosoli ar masas vidējo aerodinamisko diametru (MMAD) diapazonā no 1 līdz 4 μm ar ģeometrisko standartnovirzi (σ_g) diapazonā no 1,5 līdz 3,0 (8) (13) (14). Iespēju robežās ir jācenšas nodrošināt atbilstību šim standartam, bet, ja tas nav iespējams, ir jāsniedz eksperta atzinums. Piemēram, metālu izgarojumu daļiņas var būt mazākas par šo standartu, savukārt lādētas daļiņas, šķiedrmateriāli un higroskopiski materiāli (kas elpošanas sistēmas mitrajā vidē izplešas) šo standartu var pārsniegt.

Testējamās ķīmiskās vielas sagatavošana nesējvielā

15. Lai generētu testējamās ķīmiskās vielas attiecīgu koncentrāciju un daļiņu lielumu atmosfērā, var izmantot nesējvielu. Ieteicamā nesējviela visos gadījumos noteikti ir ūdens. Lai panāktu vajadzīgo daļiņu sadalījumu pēc lieluma, daļiņu materiālu var pakļaut mehāniskiem procesiem, tomēr jānodrošina, lai testējamā ķīmiskā viela nesadalītos un nepārmainītos. Gadījumos, kad uzskata, ka mehāniski procesi ir mainījuši testējamās ķīmiskās vielas sastāvu (piemēram, pārāk augstās temperatūrās, ko pārāk intensīvā malšanā radījusi berze), testējamās ķīmiskās vielas sastāvs ir analītiski jāpārbauda. Jāievēro vajadzīgā piesardzība, lai testējamo ķīmisko vielu nepiesārņotu. Nav nepieciešams testēt nedrūpošus graudveida materiālus, kas ir izstrādāti tā, lai būtu neieelpojami. Jāveic berzes tests, lai pierādītu, ka, apstrādājot graudveida materiālus, nerodas ieelpojamas daļiņas. Ja berzes testā tiek iegūtas ieelpojamas daļiņas, jāveic inhalācijas toksicitātes tests.

Kontrolldzīvnieki

16. Līdztekus veiktas negatīvas (gaisa) kontroles grupa nav vajadzīga. Ja testa atmosfēras ģenerēšanā izmanto nesējvielu, kas nav ūdens, nesējvielas kontrolgrupa jāizmanto tikai tad, ja nav pieejami vēsturiski inhalācijas toksicitātes dati. Ja nesējvielā iestrādātas testējamās ķīmiskās vielas toksicitātes pētījums toksicitāti neatklāj, secina, ka nesējviela testētajā koncentrācijā nav toksiska; tādējādi nesējvielas kontroles grupa nav nepieciešama.

EKSPOZĪCIJAS APSTĀKĻU MONITORINGS

Gaisa plūsma caur kameru

17. Katras ekspozīcijas laikā ir rūpīgi jākontrolē, nepārtraukti jāmonitorē un vismaz reizi stundā jāreģistrē gaisa plūsma caur kameru. Testa atmosfēras koncentrācijas (vai stabilitātes) monitorings ir visu dinamisko parametru integrāla mērīšana, kas dod iespēju netieši kontrolēt visus attiecīgos dinamiskos atmosfēras ģenerēšanas parametrus. Īpaši jāraugās, lai deguna ekspozīcijas kamerās nenotiktu izelpotā gaisa ieelpošana gadījumos, kur gaisa

plūsmas ekspozīcijas sistēmā nav pietiekama, lai nodrošinātu testējamās ķīmiskās vielas atmosfēras dinamisku plūsmu. Ir pieejamas metodikas, ko var izmantot, lai pierādītu, ka konkrētos darbības apstākļos atkārtota ieelpošana nenotiek (8) (15). Skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 19 %, un oglekļa dioksīda koncentrācija nedrīkst pārsniegt 1 %. Ja ir pamats uzskatīt, ka nav iespējams nodrošināt atbilstību šiem standartiem, skābekļa un oglekļa dioksīda koncentrācijas ir jāizmēra.

Temperatūra un relatīvais mitrums kamerā

18. Temperatūra kamerā jāuztur 22 ± 3 °C robežās. Relatīvais mitrums dzīvnieku inhalācijas zonā gan deguna, gan visa ķermeņa ekspozīciju gadījumā ir jāmonitorē un jāreģistrē vismaz trīs reizes, ja tests ilgst līdz četrām stundām, un reizi stundā, ja tas ir īsāks. Relatīvo mitrumu vēlams uzturēt 30–70 % diapazonā, bet tas var nebūt izdarāms (piemēram, kad tiek testēti maisījumi uz ūdens bāzes) vai izmērāms, jo testējamā ķīmiskā viela interferē ar testēšanas metodi.

Testējamā ķīmiskā viela: nominālā koncentrācija

19. Kad vien iespējams, ir jāaprēķina un jāreģistrē nominālā koncentrācija ekspozīcijas kamerā. Nominālā koncentrācija ir ģenerētās testējamās ķīmiskās vielas masa, ko daļa ar kameras sistēmai cauri izlaista gaisa kopējo tilpumu. Nominālo koncentrāciju neizmanto, lai raksturotu dzīvnieku ekspozīciju, taču nominālās un faktiskās koncentrācijas salīdzinājums sniedz norādes par testa sistēmas ģenerēšanas efektivitāti, tādējādi to var izmantot, lai atklātu ģenerēšanas problēmas.

Testējamā ķīmiskā viela: faktiskā koncentrācija

20. Faktiskā koncentrācija ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija inhalācijas kameras dzīvnieku inhalācijas zonā. Faktiskās koncentrācijas var uzzināt vai nu ar specifiskām metodēm (piemēram, tiešo paraugu ņemšanu, adsorbcijas vai ķīmiskās reaģēšanas metodēm un turpmāku analītisko raksturošanu), vai ar tādām nespecifiskām metodēm kā gravimetriskā filtra analīze. Gravimetriskās analīzes izmantošana ir pieņemama tikai attiecībā uz vienas sastāvdaļas pulvera aerosoliem vai aerosoliem ar zemas gaistamības šķidrumiem, turklāt šī analīze ir jāpamato ar attiecīgiem testējamās ķīmiskās vielas raksturojumiem pirms pētījuma veikšanas. Koncentrācijas noteikšanu ar gravimetrisko analīzi var veikt arī vairāku sastāvdaļu pulvera aerosoliem. Tomēr tam ir vajadzīgi analītiskie dati, kas pierāda, ka gaisā pārnestajam materiālam sastāvs ir tāds pats kā sākotnējam materiālam. Ja šāda informācija nav pieejama, pētījuma laikā var būt nepieciešams ar regulāriem intervāliem atkārtoti analizēt testējamo ķīmisko vielu (vēlams, kad tā tiek pārnēsāta gaisā). Attiecībā uz aerosola preparātiem, kas var iztvaikot vai sublimēties, ir jāpierāda, ka ar izraudzīto metodi ievāktas visas fāzes. Mērķa, nominālās un faktiskās koncentrācijas ir jānorāda pētījuma ziņojumā, bet statistiskajā analīzē, kurā aprēķina letālo koncentrāciju vērtības, izmanto vienīgi faktiskās koncentrācijas.
21. Ja iespējams, jāizmanto vienas sērijas testējamā ķīmiskā viela, un testējamais paraugs ir jāglabā apstākļos, kas uztur tā tīrību, homogenitāti un stabilitāti. Pirms pētījuma sākšanas ir jau jābūt aprakstam par testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, arī par tās tīrību un, ja tehniski iespējams, identitāti, un konstatēto piesārņotāju un piemaisījumu daudzumu. To var pierādīt ar šādiem datiem (bet ne tikai): aiztures laiks un relatīvā maksimuma zona, molekulmasa no masspektrometrijas vai gāzhromatogrāfijas analīzes, vai citām aplēsēm. Lai gan testēšanas laboratorija nav atbildīga par testējamā parauga identitāti, tai būtu ieteicams vismaz zināmā mērā pārliecināties par sponsora sniegto raksturojumu (piemēram, krāsa, fizikālās īpašības utt.)
22. Ekspozīcijas atmosfēru uztur iespējami nemainīgu un nepārtraukti un/vai periodiski monitorē atkarībā no analīzes metodes. Ja paraugus ņem periodiski, četru stundu pētījuma laikā kameras atmosfēras paraugi ir jāņem vismaz divas reizes. Ja sakarā ar ierobežotu gaisa caurplūdumu vai zemu koncentrāciju tas nav iespējams, visā ekspozīcijas periodā var paņemt vienu paraugu. Ja tiek konstatētas ievērojamas svārstības starp paraugiem, nākamo koncentrāciju testēšanā katras ekspozīcijas laikā jāņem četři paraugi. Atsevišķiem kameras koncentrācijas paraugiem nevajadzētu atšķirties no kameras vidējās koncentrācijas vairāk kā par ± 10 % gāzēm un tvaikiem un ± 20 % šķidrumiem vai cietiem aerosoliem. Ir jāaprēķina un jāreģistrē laiks, kas vajadzīgs, līdz kamerā iestājas līdzsvara stāvoklis (t_{95}). Ekspozīcijas laiks ilgst visu testējamās ķīmiskās vielas ģenerēšanas laiku, ieskaitot laiku, kas vajadzīgs, lai sasniegtu t_{95} . Norādījumi par t_{95} aplēsēm ir sniegti GD 39 (8).
23. Ļoti sarežģītiem maisījumiem, kas sastāv no tvaikiem/gāzēm, un aerosoliem (piemēram, degšanas atmosfērām un testējamām ķīmiskām vielām, kuru izplūde notiek no galīgajam izmantojumam paredzētiem izstrādājumiem/ierīcēm) katra fāze inhalācijas kamerā var izturēties atšķirīgi, tāpēc katrai fāzei (tvaiki/gāze un aerosols) ir jāizvēlas vismaz viena indikatorviela (analīts), kas parasti ir maisījuma galvenā aktīvā viela. Ja testējamā ķīmiskā viela ir maisījums, analītiskā koncentrācija ir jānorāda kopējam maisījumam, nevis tikai aktīvajai sastāvdaļai vai komponentam (analītam). Papildu informācija par faktiskajām koncentrācijām ir pieejama GD 39 (8).

Testējamā ķīmiskā viela: daļiņu sadalījums pēc lieluma

24. Aerosolu daļiņu sadalījums pēc lieluma jānosaka vismaz divas reizes katras četru stundu ekspozīcijas laikā, izmantojot kaskādes impaktoru vai alternatīvu instrumentu, piemēram, aerodinamisko daļiņu mērītāju. Ja var pierādīt, ka ar kaskādes impaktoru vai alternatīvo instrumentu iegūtie rezultāti ir līdzvērtīgi, alternatīvo instrumentu var izmantot visā pētījumā. Lai iegūtu apstiprinājumu, ka galvenais ievākšanas instruments nodrošina pietiekamu vākšanas efektivitāti, paralēli šim galvenajam instrumentam ir jāizmanto otra iekārta, piemēram, gravimetriskais filtrs vai atsītējs / gāzes barbotieris. Daļiņu lieluma analizē iegūtajai masas koncentrācijas vērtībai jābūt saprātīgās robežās salīdzinājumā ar filtra analizē iegūto masas koncentrācijas vērtību (sk. GD 39 (8)). Ja pētījuma agrīnā posmā var pierādīt līdzvērtību, turpmāki apstiprinoši mērījumi nav vajadzīgi. Dzīvnieku labturības nolūkos jāveic pasākumi, kas iespējami mazinātu nepārliciecināšu datu iegūvi, kuru dēļ var būt nepieciešams atkārtot ekspozīciju. Ir jānosaka daļiņu lielums tādiem tvaikiem, kuru kondensāts varētu izveidot aerosolu vai kuru veidotā atmosfērā tiek konstatētas daļiņas, kas liek domāt par jauktu fāžu iespējamību (sk. 14. punktu).

PROCEDŪRA**Galvenais tests**

25. Katrā posmā izmanto trīs katra dzimuma dzīvniekus vai sešus uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus. Ja deguna ekspozīcijai tiek pakļauti grauzēji, kas nav žurkas, maksimālos ekspozīcijas ilgumus var koriģēt tā, lai iespējami mazinātu attiecīgajai sugai raksturīgās ciešanas. Sākuma devai izmantojamo koncentrācijas līmeni izvēlas no četriem noteiktajiem līmeņiem, un sākumkoncentrācijas līmenim jābūt tādam, kas, visticamāk, izraisīs toksicitāti dažiem no devu saņemušajiem dzīvniekiem. Testēšanas shēmas gāzēm, tvaikiem un aerosoliem (ietvertas 2.–4. papildinājumā) paredz testēšanu ar CLP 1.–4. kategorijas robežvērtībām (9) gāzēm (100, 500, 2 500, 20 000 ppm/4 h) (2. papildinājums), tvaikiem (0,5, 2, 10, 20 mg/l/4 h) (3. papildinājums) un aerosoliem (0,05, 0,5, 1, 5 mg/l/4 h) (4. papildinājums). Savukārt 5. kategorija, kas Regulā (EK) Nr. 1272/2008 nav ietverta (9), attiecas uz koncentrācijām, kuras pārsniedz attiecīgās robežkoncentrācijas. Katrai sākumkoncentrācijai piemēro attiecīgo testēšanas shēmu. Atkarībā no humāni nonāvēto vai mirušo dzīvnieku skaita testēšanas procedūra seko norādītajām bultām, līdz var noteikt kategoriju.
26. Laika intervāls starp ekspozīcijas grupām ir atkarīgs no toksicitātes pazīmju parādīšanās, ilguma un smaguma. Nākamā koncentrācijas līmeņa iedarbībai dzīvnieki jāpakļauj tikai tad, kad gūta pietiekama pārliecība par iepriekšējā testā izdzīvojušajiem dzīvniekiem. Lai novērotu aizkavētu toksicitāti, ieteicams ievērot 3–4 dienu starplaiku starp ekspozīcijām ar katru koncentrācijas līmeni. Starplaiku var koriģēt pēc vajadzības, piemēram, gadījumos, kad atbildes reakcijas nav pārliecinošas.

Pielaujamā daudzuma tests

27. Pielaujamā daudzuma testu izmanto gadījumos, kad par testējamo ķīmisko vielu ir zināms vai sagaidāms, ka tā faktiski būs netoksiska, t. i., tā izraisīs toksisku atbildes reakciju tikai tad, ja koncentrācija pārsniedz regulatīvo robežkoncentrāciju. Informāciju par testējamās ķīmiskās vielas toksiskumu var iegūt no zināšanām par citām līdzīgām pārbaudītām vielām vai citiem līdzīgiem maisījumiem, ņemot vērā to sastāvdaļu identitāti un procentuālo īpatsvaru, par kurām ir zināms, ka tām piemīt būtisks toksiskums. Situācijās, kad nav informācijas par toksiskumu vai tā ir nepietiekama, vai arī ir paredzams, ka testējamā ķīmiskā viela būs toksiska, ir jāveic galvenais tests (papildu norādījumi pieejami GD 39 (8)).
28. Saskaņā ar parasto procedūru trīs katra dzimuma dzīvniekus vai sešus uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus pakļauj šādu koncentrāciju iedarbībai: 20 000 ppm gāzēm, 20 mg/l tvaikiem un 5 mg/l putekļiem/miglai (ja tās var sasniegt), kas būtu šīs testēšanas metodes pielaujamā daudzuma tests. Testējot aerosolus, galvenajam mērķim jābūt ieelpojama lieluma daļiņu iegūšanai (t. i., 1–4 µm MMAD). Ar lielāko daļu testējamo ķīmisko vielu tas ir iespējams koncentrācijā 2 mg/l. Testus ar aerosoliem koncentrācijā, kas pārsniedz 2 mg/l, drīkst veikt tikai tad, ja var iegūt ieelpojama lieluma daļiņas (sk. GD 39 (8)). Saskaņā ar GHS (16) dzīvnieku labturības apsverumu dēļ ir ieteicams izvairīties no testiem ar koncentrācijām, kas pārsniedz robežkoncentrācijas. Vai neveikt testus ar GHS 5. kategoriju (16), kas nav paredzēta Regulā (EK) Nr. 1272/2008 (9), ir jāapsver tikai tad, ja ļoti iespējams, ka šādu testu rezultāti būtu tieši nozīmīgi cilvēku veselības aizsardzībā, un tādā gadījumā pētījuma ziņojumā tas jāpamato. Sprādzienbīstamu testējamo ķīmisko vielu gadījumā ir jācenšas izvairīties no apstākļiem, kuros var izraisīties sprādziens. Lai lieki neizmantotu dzīvniekus, pirms pielaujamā daudzuma testa ir jāveic tests bez dzīvniekiem, nodrošinot, ka pielaujamā daudzuma testa kameras apstākļi ir sasniegti.

NOVĒROJUMI

29. Ekspozīcijas perioda laikā dzīvnieki ir regulāri klīniski jānovēro. Pēc ekspozīcijas klīniskie novērojumi ekspozīcijas dienā jāveic vismaz divreiz vai biežāk, ja to indicē dzīvnieku reakcija uz vielas saņemšanu, un vismaz reizi dienā nākamās 14 dienas. Novērošanas perioda ilgums nav noteikts, bet tas ir jānosaka atkarībā no klīnisko pazīmju veida un iestāšanās laika, kā arī no atveseļošanās perioda ilguma. Ir svarīgi, kādos laikos parādās un izzūd toksicitātes pazīmes, it sevišķi, ja tām ir tendence aizkavēties. Visus novērojumus regulāri reģistrē, par katru dzīvnieku glabājot atsevišķus pierakstus. Visi mirstošie dzīvnieki un dzīvnieki, kam vērojamas lielu sāpju un/vai ilgstošu ciešanu pazīmes, dzīvnieku labturības nolūkos ir humāni jānonāvē. Veicot pārbaudes, lai pamanītu klīniskas toksicitātes pazīmes, ir jāuzmanās, lai sākotnējs savārgums un tādas pārejošas pārmaiņas elpošanā,

ko izraisījuši ekspozīcijas procedūra, netiktu kļūdaini uzskatītas par vielas ievadīšanas ietekmi. Jāņem vērā principi un kritēriji, kas apkopoti *Humane Endpoints Guidance Document* (7). Ja dzīvnieki ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ vai atrasti miruši, iespējami precīzi ir jāreģistrē nāves iestāšanās laiks.

30. Novērojot dzīvniekus būros, ir jāpievērš uzmanība ādas un apmatojuma, acu un gļotādas, kā arī elpošanas, asinsrites, veģetatīvās un centrālās nervu sistēmas, somatomotorikas un uzvedības reakciju pārmaiņām. Ja iespējams, uzmanība jāpievērš jebkādam atšķirībām starp lokālo un sistēmisko ietekmi. Uzmanība jāpievērš novērojumiem attiecībā uz drebuļiem, krampjiem, siekalošanos, caureju, letarģiju, miegu un komu. Rektāli temperatūras mērījumi var nodrošināt papildu liecības par reflektorisku bradipnoju vai hipotermiju/hipertermiju, kas saistīta ar vielas saņemšanu vai kustību ierobežošanu.

Ķermeņa svars

31. Katra dzīvnieka svars ir jāreģistrē vienu reizi aklimatizēšanās periodā, ekspozīcijas dienā pirms ekspozīcijas (0. diena) un vismaz pirmajā, trešajā un septītajā dienā (un reizi nedēļā pēc tam), kā arī nāves vai eitanāzijas brīdī, ja tas notiek pēc pirmās dienas. Ķermeņa svaru uzskata par ļoti svarīgu toksicitātes pazīmi, tādēļ dzīvnieki, kam vērojams noturīgs $\geq 20\%$ dekrementa salīdzinājumā ar vērtībām, kuras iegūtas priekšizpētē, ir cieši jāmonitorē. Izdzīvojušos dzīvniekus nosver un humāni nonāvē pēcksekspozīcijas perioda beigās.

Patoloģija

32. Visiem testa dzīvniekiem, arī tiem, kas testa laikā nobeigušies vai kam dzīvnieku labturības apsvērumu dēļ izdarīta eitanāzija un kas izņemti no pētījuma, ir jāveic pilna autopsija. Ja autopsiju nevar izdarīt tūlīt pēc mirušā dzīvnieka atklāšanas, dzīvnieks ir jāievieto ledusskapī (bez sasaldēšanas) temperatūrā, kas ir pietiekami zema, lai iespējami mazinātu autolīzi. Autopsija jāveic iespējami drīz, parasti dienas vai divu dienu laikā. Visas smagās patoloģiskās pārmaiņas ir jāreģistrē par katru dzīvnieku, īpašu uzmanību pievēršot jebkādam pārmaiņām elpošanas sistēmā.
33. Lai paplašinātu pētījuma interpretējošo vērtību, var apsvērt, vai apriori neparedzēt papildu pārbaudes, piemēram, izdzīvojušo žurku plaušu svara noteikšanu un/vai tādas liecības par kairinājumu, ko gūst elpošanas sistēmas mikroskopiskā izmeklēšanā. Tāpat var izmeklēt tādus orgānus, kas liecina par smagām patoloģiskām pārmaiņām dzīvniekos, kuri izdzīvojuši 24 vai vairāk stundas, un orgānus, par ko ir zināms vai gaidāms, ka tie tiks skarti. Visas elpošanas sistēmas mikroskopiska izmeklēšana var nodrošināt lietderīgu informāciju par testējamajām ķīmiskajām vielām, kas reaģē ar ūdeni, piemēram, skābēm un higroskopiskām testējamajām ķīmiskajām vielām.

DATI UN ZIŅOJUMU SAGATAVOŠANA

Dati

34. Ir jāsniedz dati par katru dzīvnieka svaru un autopsijas atradi. Klīnisko novērojumu dati jāapkopo tabulā, par katru testa grupu norādot to dzīvnieku skaitu, kas izmantoti, to dzīvnieku skaitu, kuriem parādījušās noteiktas toksicitātes pazīmes, to dzīvnieku skaitu, kuri testa laikā atrasti nobeigušies vai ir nonāvēti humānu apsvērumu dēļ, atsevišķu dzīvnieku nāves iestāšanās laiku, toksiskās ietekmes raksturu, norisi laikā un atgriezeniskumu, kā arī autopsijas atradi.

Testēšanas pārskats

35. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testa dzīvnieki un dzīvnieku turēšana:

- apraksts par apstākļiem būros, arī dzīvnieku skaits (vai skaita maiņa) katrā būrī, pakaiši, temperatūra un relatīvais mitrums, apgaismojuma ilgums un informācija par uzturu,
- izmantotās sugas/līnija un pamatojums, kādēļ ir izmantota cita suga, kas nav žurka,
- dzīvnieku skaits, vecums un dzimums,
- nejaušināšanas metode,
- sīkas ziņas par barības un ūdens kvalitāti (ieskaitot uztura veidu/avotu, ūdens avotu),
- jebkāda pirmstesta sagatavošana, ieskaitot uzturu, karantīnu un slimības ārstēšanu.

Testējamā ķīmiskā viela:

- fizikālā daba, tīrība un attiecīgos gadījumos arī fizikālķīmiskās īpašības (ieskaitot izomerizāciju),
- identifikācijas dati un reģistrācijas numurs Ķīmijas referatīvajā žurnālā (CAS), ja zināms.

Nesējviela:

- nesējvielas izmantošanas pamatojums un nesējvielas izvēles pamatojums (ja tā nav ūdens),
- vēsturiski vai vienlaicīgi dati, kas pierāda, ka nesējviela neietekmē pētījuma rezultātu.

Inhalācijas kamera:

- inhalācijas kameras apraksts, ieskaitot izmērus un tilpumu,
- dzīvnieku ekspozīcijai un atmosfēras ģenerēšanai izmantotā aprīkojuma izcelsme un apraksts,
- temperatūras, mitruma, daļiņu lieluma un faktiskās koncentrācijas mērīšanas aprīkojums,
- gaisa avots, pievadītā un aizvadītā gaisa apstrāde un izmantotā kondicionēšanas sistēma,
- metodes, ko izmanto homogēnas testa atmosfēras nodrošināšanas aprīkojuma kalibrēšanai,
- spiediena starpība (pozitīva vai negatīva),
- ekspozīcijas portu skaits kamerā (deguna ekspozīcija); dzīvnieku atrašanās vieta sistēmā (visa ķermeņa ekspozīcija),
- testa atmosfēras īslaicīga homogenitāte/stabilitāte,
- temperatūras un mitruma sensoru atrašanās vieta un testa atmosfēras paraugu ņemšana kamerā,
- gaisa caurplūduma rādītāji: gaisa caurplūdums uz vienu ekspozīcijas portu (deguna ekspozīcija) vai dzīvniek-slodze/kamera (visa ķermeņa ekspozīcija),
- attiecīgā gadījumā informācija par skābekļa un oglekļa dioksīda mērīšanai izmantoto aprīkojumu,
- laiks, kas vajadzīgs, lai inhalācijas kamerā sasniegtu līdzsvaru (t_{95}),
- tilpuma nomaiņu skaits stundā,
- mērīšanas ierīces (attiecīgā gadījumā).

Ekspozīcijas dati:

- pamatojums par mērķkoncentrācijas izvēli galvenajam pētījumam,
- nominālās koncentrācijas (inhalācijas kamerā ģenerētās testējamās ķīmiskās vielas kopējā masa, kas dalīta ar kamerai caurplūdušā gaisa tilpumu),
- testējamās ķīmiskās vielas faktiskās koncentrācijas, kas ievāktas no dzīvnieka inhalācijas zonas. Testējamajiem maisījumiem, kas veido heterogēnas fizikālās formas (gāzes, tvaiki, aerosoli), katru var analizēt atsevišķi,
- visas gaisa koncentrācijas pārskatā ir jānorāda masas vienības (piemēram, mg/l, mg/m³ utt.) Iekavās var uzrādīt arī tilpuma vienības (piemēram, ppm, ppb),
- daļiņu sadalījums pēc lieluma, masas vidējais aerodinamiskais diametrs (MMAD) un ģeometriskā standart-novirze (σ_g), tostarp to aprēķināšanas metodes. Ziņojumā jāietver atsevišķu daļiņu lieluma analīzes.

Testēšanas apstākļi:

- sīka informācija par testējamās ķīmiskās vielas preparātu, arī par visām procedūrām, kas izmantotas cietu vielu daļiņu lieluma samazināšanai vai testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu sagatavošanai. Gadījumos, kad mehāniski procesi ir iespējami, mainījuši testējamās ķīmiskās vielas sastāvu, ziņojumā jāietver tādu analīžu rezultāti, kurās verificēts testējamās ķīmiskās vielas sastāvs,
- apraksts (vēlams, kopā ar shēmu) par iekārtu, ar kuru ģenerē testa atmosfēru un dzīvniekus pakļauj tās iedarbībai,
- sīka informācija par izmantoto ķīmiski analītisko metodi un metodes validēšanu (ieskaitot to, cik efektīva ir testējamās ķīmiskās vielas atgūšana no paraugu ņemšanas vides),
- testa koncentrāciju izvēles pamatojums.

Rezultāti:

- tabula ar kameras temperatūru, mitrumu un gaisa plūsmu,
- tabula ar datiem par kameras nominālo un faktisko koncentrāciju,
- tabula ar datiem par daļiņu lielumu, ieskaitot analītisko paraugu ņemšanas datus, daļiņu sadalījumu pēc lieluma un MMAD un σ_g aprēķinus,
- tabula ar datiem par katra dzīvnieka atbildes reakciju un koncentrācijas līmeni (t. i., dzīvnieki, kam izpaudušās toksicitātes pazīmes, arī mirstība; ietekmes veids, ietekmes smagums un ilgums),
- pētījuma dienās ievāktā informācija par katra dzīvnieka svaru, nāves datums un laiks, ja nāve iestājusies pirms paredzētās eitanāzijas, toksicitātes pazīmju parādīšanās gaita un par katru dzīvnieku norāde, vai šīs pazīmes bijušas atgriezeniskas,
- katra dzīvnieka autopsijas atrade un histopatoloģiskās izmeklēšanas rezultāti, ja pieejami,
- CLP kategorijas klasifikācija un LC₅₀ robežvērtība.

Rezultātu interpretācija un komentāri:

- īpaši svarīgi ir aprakstīt metodes, kas izmantotas, lai nodrošinātu, ka ir apmierināti šīs testa metodes kritēriji, piemēram, attiecībā uz robežkoncentrācijām vai daļiņu lielumu,
- ir jāapspriež daļiņu ieelpojamība, ņemot vērā kopējos konstatējumus, it sevišķi, ja nav izdevies nodrošināt atbilstību daļiņu lieluma kritērijiem,
- pētījuma kopējā novērtējumā ir jānorāda nominālās un faktiskās koncentrācijas noteikšanai izmantoto metožu saskaņotība, kā arī faktiskās koncentrācijas attiecība pret nominālo,
- jāapspriež, kāds varētu būt nāves cēlonis un galvenais iedarbības veids (sistēmisks attiecībā pret vietēju),
- jāsniedz paskaidrojums, ja, pamatojoties uz ESAO *Guidance Document on Humane Endpoints* (7) kritērijiem, bija humāni jānonāvē dzīvnieki, kas cieta sāpes vai izrādīja smagu un ilgstošu ciešanu pazīmes.

LITERATŪRA

- (1) Šā pielikuma B.2. nodaļa "Akūtā inhalācijas toksicitāte".
- (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 Schleder E (1999). Acute Toxic Class Methods: Alternatives to LD/LC₅₀ Tests. *ALTEX* 1: 129-134.
 - (5) Šā pielikuma B.1.b nodaļa "Akūts perorāls toksiskums – akūta toksiskuma klases metode".
 - (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. Pieejams: <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. Pieejams: <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. Pieejams: <http://www.oecd.org/env/testguidelines>.
 - (9) Eiropas Parlamenta un Padomes 2008. gada 16. decembra Regula (EK) Nr. 1272/2008 par vielu un maisījumu klasificēšanu, marķēšanu un iepakojšanu un ar ko groza un atceļ Direktīvas 67/548/EEK un 1999/45/EK un groza Regulu (EK) Nr. 1907/2006 (OV L 353, 31.12.2008., 1. lpp.).
 - (10) Šā pielikuma B.40. nodaļa "In vitro ādas erozija: transkutānās elektriskās pretestības (TEP) tests".
 - (11) Šā pielikuma B.40.a nodaļa "Ādas erozijas in vitro tests: cilvēka ādas modeļa tests".
 - (12) OECD (2005). In Vitro Membrane Barrier Test Method for Skin Corrosion. OECD Guideline for testing of chemicals No. 435, OECD, Paris. Pieejams: <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. Pieejams: http://www.unece.org/trans/danger/publi/ghs/ghs_welcome_e.html.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJA

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

*2. papildinājums***Katrai sākumkoncentrācijai ievērojamā procedūra gāzēm (ppm/4 h)**Vispārīgas piezīmes ⁽¹⁾

Attiecībā uz katru sākumkoncentrāciju ir jāievēro procedūra, kas izklāstīta attiecīgajās testēšanas shēmās, kuras iekļautas šajā papildinājumā.

2.a papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 100 ppm.

2.b papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 500 ppm.

2.c papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 2 500 ppm.

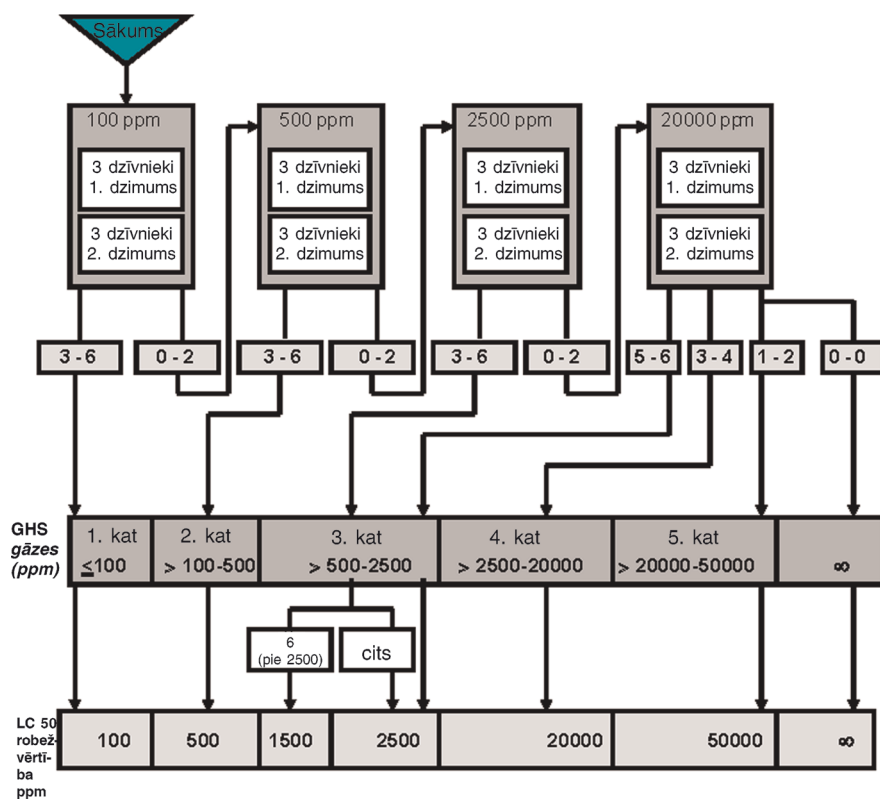
2.d papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 20 000 ppm.

Testēšanas procedūra seko norādītajām bultām atkarībā no humāni nonāvēto vai mirušo dzīvnieku skaita.

⁽¹⁾ Turpmāk norādītajās tabulās ir atsauces uz Ķīmisko vielu klasificēšanas un marķēšanas vispārēji saskaņoto sistēmu (GHS). ES ekvivalents ir Regula (EK) Nr. 1272/2008. Attiecībā uz akūto inhalācijas toksicitāti Regulā (EK) Nr. 1272/2008 (9) nav paredzēta 5. kategorija.

2.a papildinājums

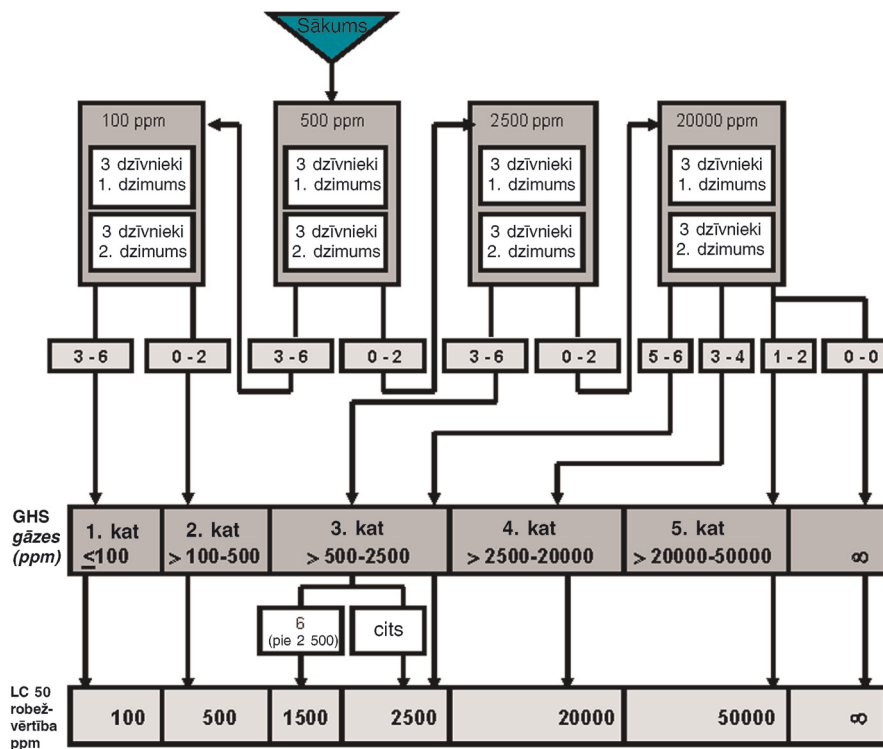
**Akūtā inhalācijas toksicitāte –
testēšanas procedūra ar sākum koncentrāciju 100 ppm / 4 h gāzēm**



- Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
- 0-6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.
- GHS: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.
- ∞: neklasificēts.
- Testēšana ar ≥ 20 000 ppm / 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

2.b papildinājums

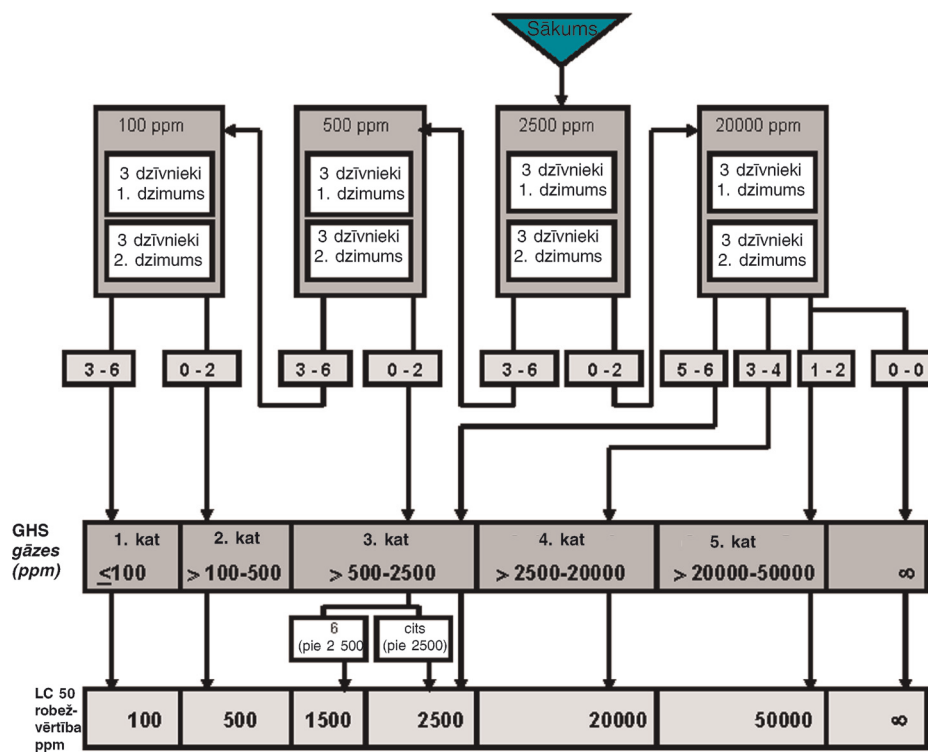
**Akūtā inhalācijas toksicitāte –
testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 500 ppm/4 h gāzēm**



- Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
- 0-6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.
- GHS: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.
- ∞: neklasificēts.
- Testēšana ar $\geq 20\,000$ ppm / 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

2.c papildinājums

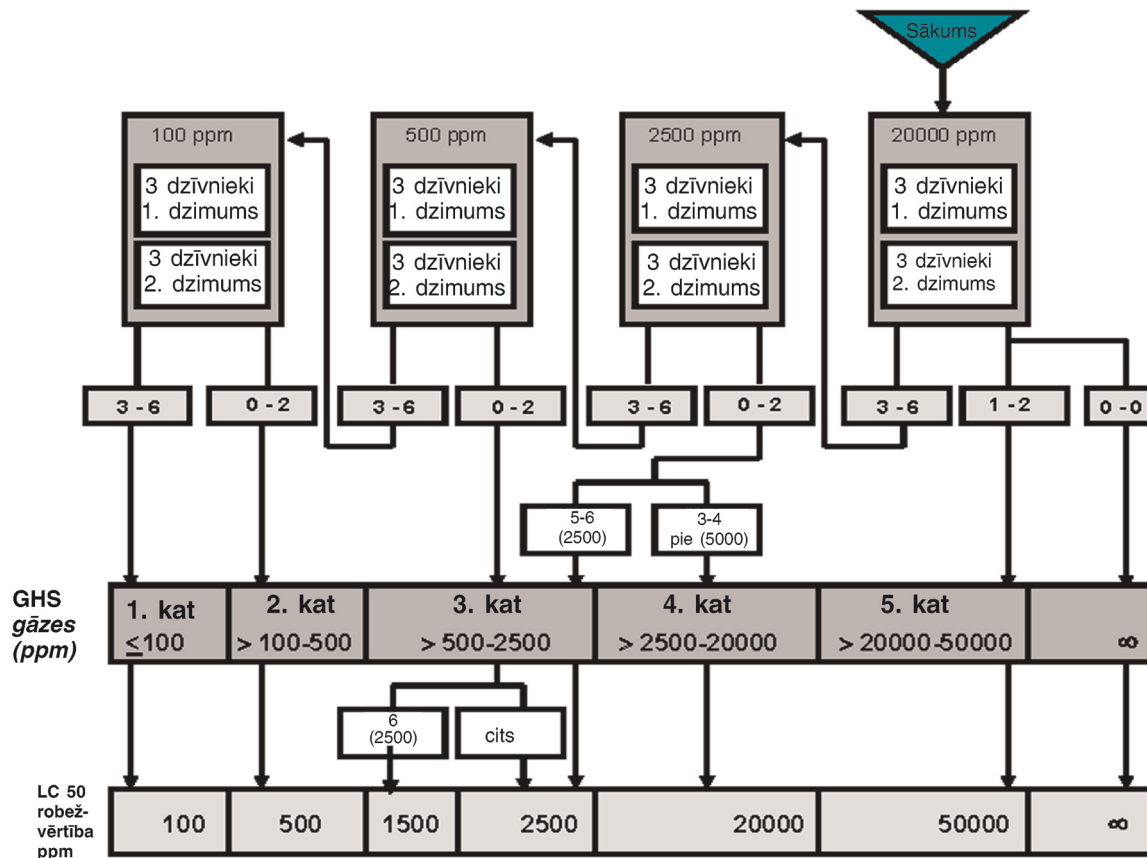
**Akūtā inhalācijas toksicitāte –
testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 2 500 ppm/4 h gāzēm**



- Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
- 0-6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.
- GHS: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.
- ∞: neklasificēts.
- Testēšana ar ≥ 20 000 ppm / 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

2.d papildinājums

**Akūtā inhalācijas toksicitāte –
testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 20 000 ppm/4 h gāzēm**



- Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
- 0-6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.
- GHS: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.
- ∞: neklasificēts.
- Testēšana ar ≥ 20 000 ppm/ 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

*3. papildinājums***Katrai sākumkoncentrācijai ievērojamā procedūra tvaikiem (mg/l/4 h)**Vispārīgas piezīmes ⁽¹⁾

Attiecībā uz katru sākumkoncentrāciju ir jāievēro procedūra, kas izklāstīta attiecīgajās testēšanas shēmās, kuras iekļautas šajā papildinājumā.

3.a papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 0,5 mg/l.

3.b papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 2 mg/l.

3.c papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 10 mg/l.

3.d papildinājums.: Sākumkoncentrācija ir 20 mg/l.

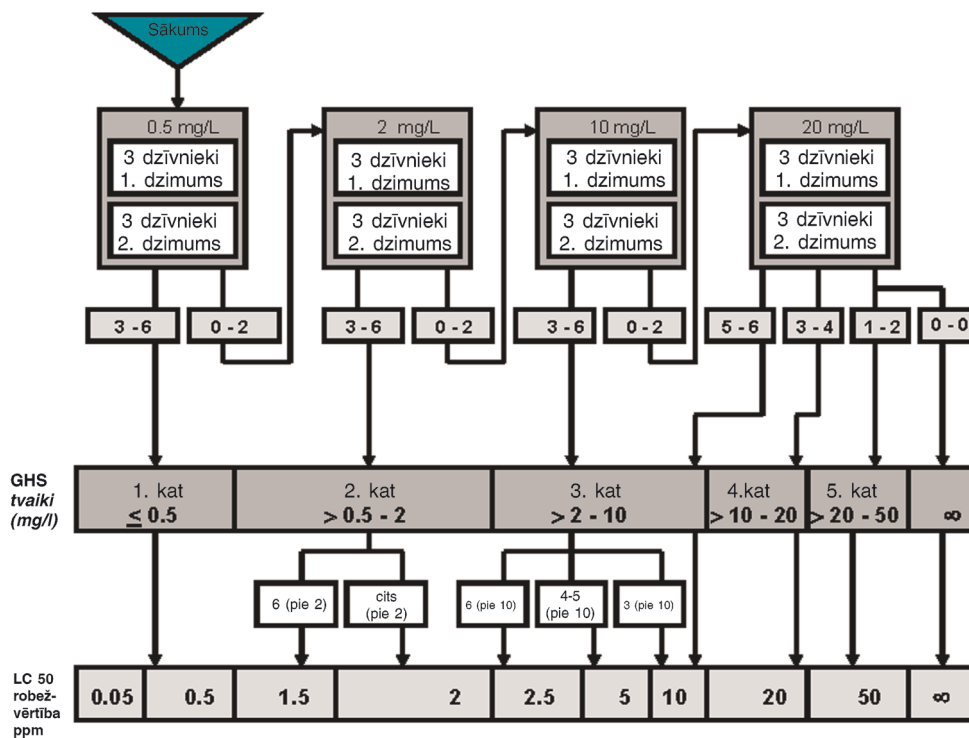
Testēšanas procedūra seko norādītajām bultām atkarībā no humāni nonāvēto vai mirušo dzīvnieku skaita.

⁽¹⁾ Turpmāk norādītajās tabulās ir atsauces uz ķīmisko vielu klasificēšanas un marķēšanas vispārēji saskaņoto sistēmu (GHS). ES ekvivalents ir Regula (EK) Nr. 1272/2008. Attiecībā uz akūto inhalācijas toksicitāti Regulā (EK) Nr. 1272/2008 (9) nav paredzēta 5. kategorija.

3.a papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

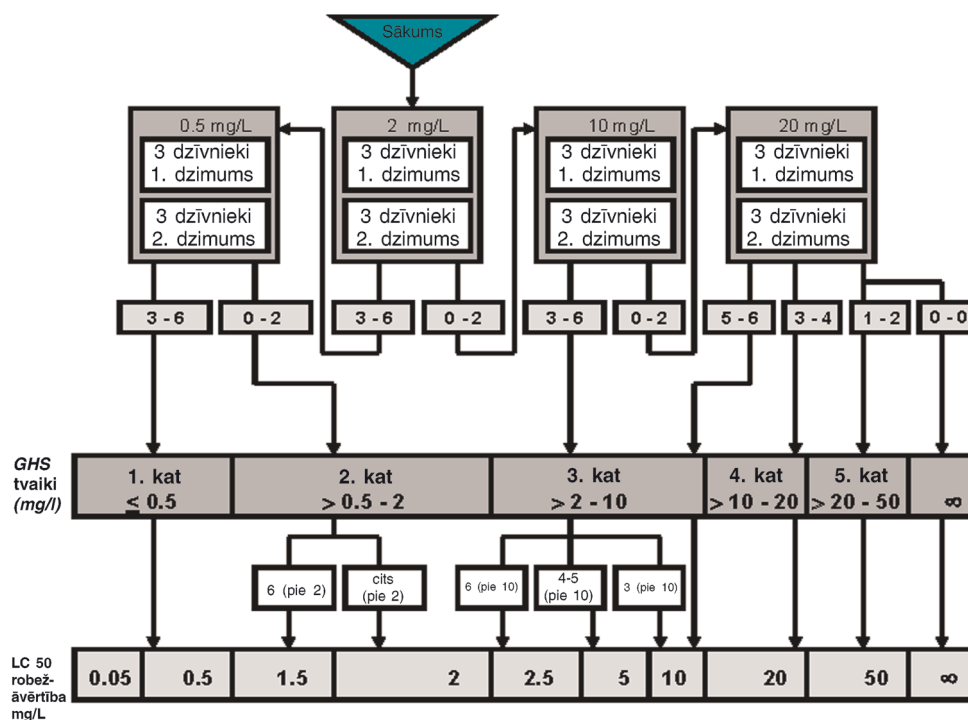
Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 0,5 mg/l/4h tvaikiem



- Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
- 0-6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.
- GHS: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.
- ∞: neklasificēts.
- Testēšana ar 50 mg/L/ 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

3.b papildinājums

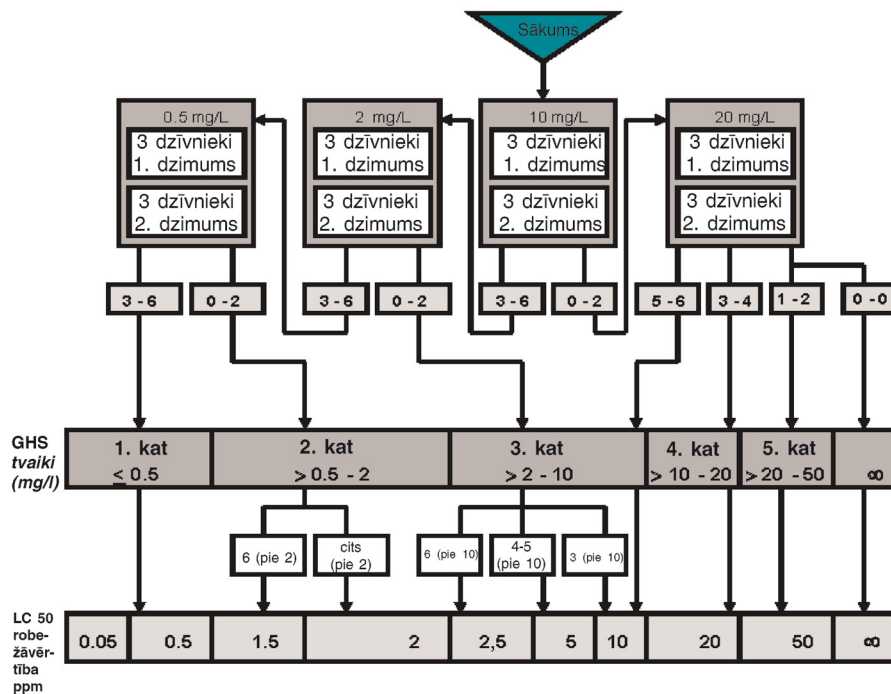
**Akūtā inhalācijas toksicitāte –
Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 2 mg/l/4 h tvaikiem**



- Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
- 0-6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.
- *GHS*: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.
- ∞: neklasificēts.
- Testēšana ar 50 mg/L/ 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

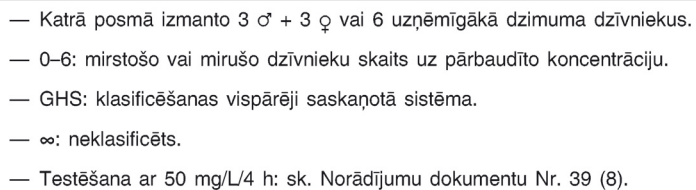
3.c papildinājums

**Akūtā inhalācijas toksicitāte –
Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 10 mg/l/4 h tvaikiem**



- Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
- 0-6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.
- GHS: klasificēšanas vispārēji saskaņotā sistēma.
- ∞: neklasificēts.
- Testēšana ar 50 mg/L/ 4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

Akūtā inhalācijas toksicitāte –
Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 20 mg/l/4 h tvaikiem



— Testēšana ar 50 mg/L/4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

*4. papildinājums***Katrai sākumkoncentrācijai ievērojamā procedūra aerosoliem (mg/l/4 h)**Vispārīgas piezīmes ⁽¹⁾

Attiecībā uz katru sākumkoncentrāciju ir jāievēro procedūra, kas izklāstīta attiecīgajās testēšanas shēmās, kuras iekļautas šajā papildinājumā.

4.a papildinājums: Sākumkoncentrācija ir 0,05 mg/l.

4.b papildinājums: Sākumkoncentrācija ir 0,5 mg/l.

4.c papildinājums: Sākumkoncentrācija ir 1 mg/l.

4.d papildinājums: Sākumkoncentrācija ir 5 mg/l.

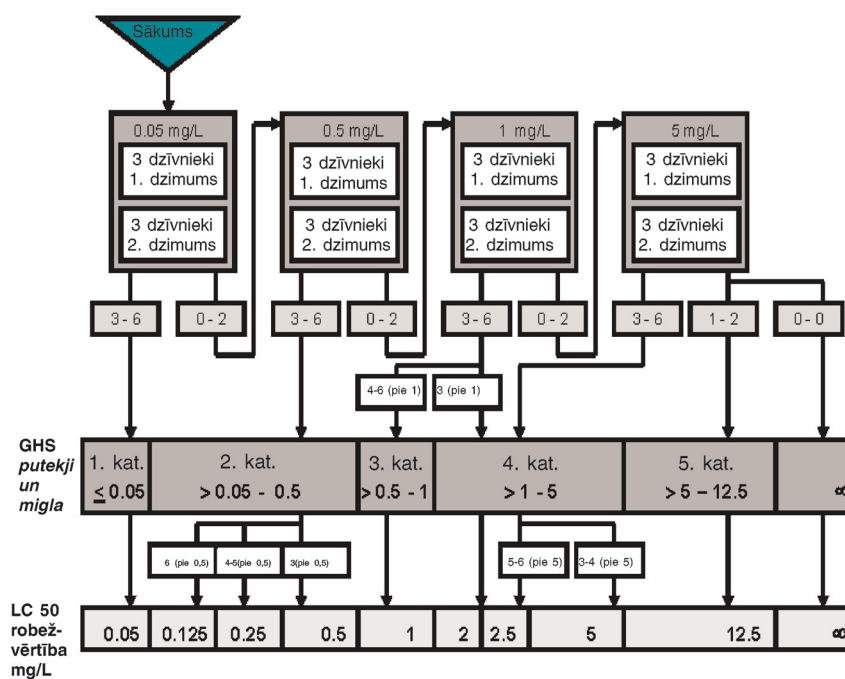
Testēšanas procedūra seko norādītajām bultām atkarībā no humāni nonāvēto vai mirušo dzīvnieku skaita.

⁽¹⁾ Turpmāk norādītajās tabulās ir atsaucies uz Ķīmisko vielu klasificēšanas un marķēšanas vispārēji saskaņoto sistēmu (GHS). ES ekvivalents ir Regula (EK) Nr. 1272/2008. Attiecībā uz akūto inhalācijas toksicitāti Regulā (EK) Nr. 1272/2008 (9) nav paredzēta 5. kategorija.

4.a papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

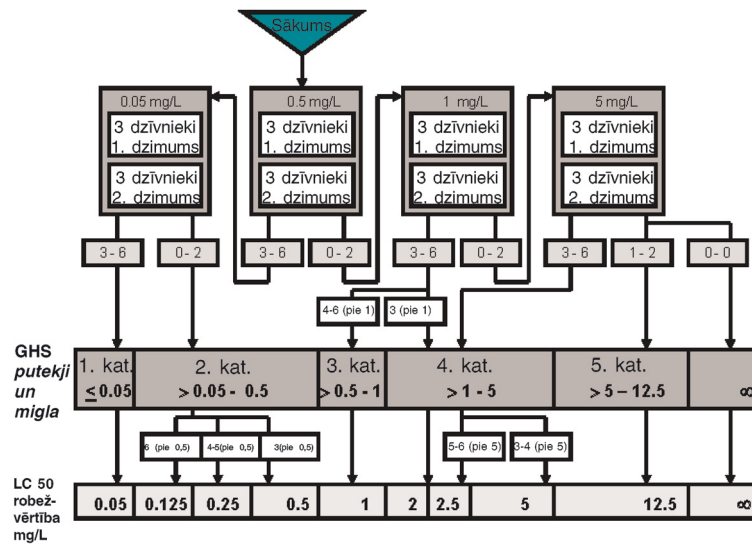
Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 0.05 mg/L/4 h tvaikiem



- Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
- 0–6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pār baudīto koncentrāciju.
- GHS: klasifikācijas vispārēji saskaņotā sistēmā.
- ∞: neklasificēts.
- Testēšana ar 12,5 mg/L/4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

4.b papildinājums

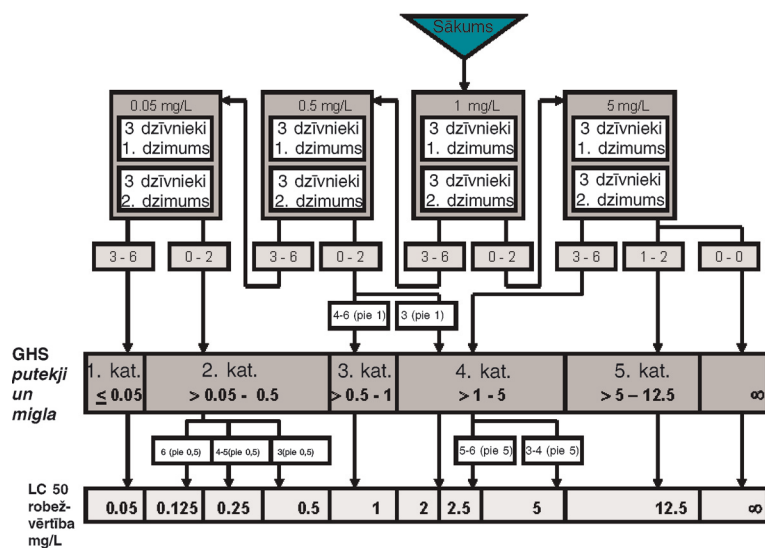
**Akūtā inhalācijas toksicitāte –
testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 0,5 mg/l/4 h aerosoliem**



- Katrā posmā izmanto 3 ♂ + 3 ♀ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
- 0-6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.
- GHS: klasifikācijas vispārēji saskaņotā sistēma.
- ∞: neklasificēts.
- Testēšana ar 12,5 mg/L/4 h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

4.c papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –
Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 1 mg/l/4 h aerosoliem

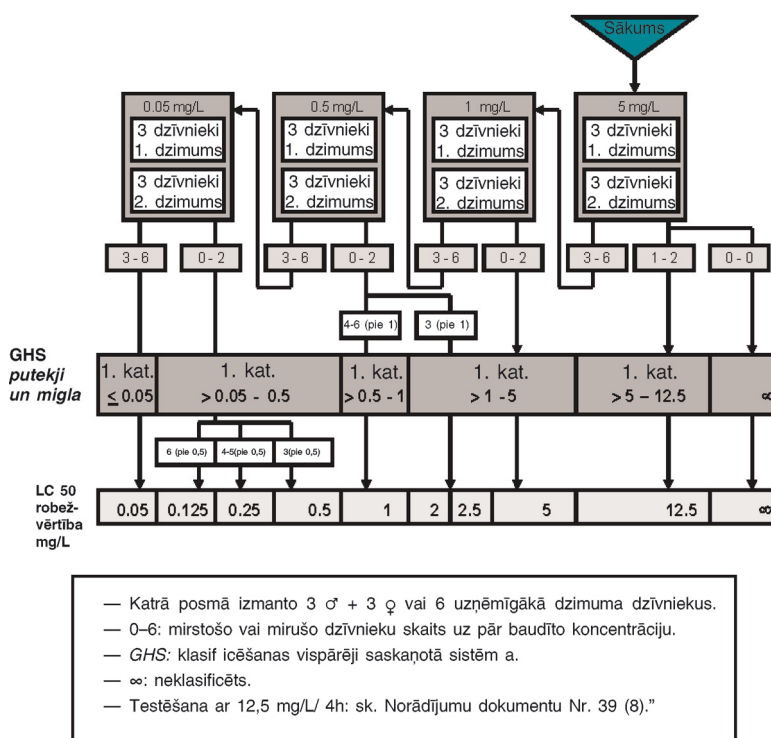


- Katrā posmā izmanto 3 σ + 3 φ vai 6 uzņēmīgākā dzimuma dzīvniekus.
- 0-6: mirstošo vai mirušo dzīvnieku skaits uz pārbaudīto koncentrāciju.
- GHS: klasifikācijas vispārīgi saskaņotā sistēma.
- ∞ : neklasificēts.
- Testēšana ar 12,5 mg/L/4h: sk. Norādījumu dokumentu Nr. 39 (8).

4.d papildinājums

Akūtā inhalācijas toksicitāte –

Testēšanas procedūra ar sākumkoncentrāciju 5 mg/l/4 h aerosoliem



9) pielikuma C.10. nodaļu aizstāj ar šādu:

“C.10. AEROBĀS NOTEKŪDEŅU ATTĪRĪŠANAS IMITĀCIJAS TESTS. C.10.-A. AKTĪVO DŪŅU BLOKI – C.10.-B. BIOPLĒVES

C.10.-A. Aktīvo dūņu bloki

IEVADS

- Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (turpmāk – TG) 303 (2001. gads). Divdesmitā gadsimta 50. gados tika secināts, ka jaunās virsmaktīvās vielas rada pārmērīgu ūdens putošanas notekūdeņu attīrīšanas iekārtās un upēs. Aerobajā attīrīšanā šīs virsmaktīvās vielas netika pilnībā noārdītas, un dažos gadījumos tās ierobežoja citu organisko vielu noārdīšanos. Šajā saistībā tika uzsākti daudzi pētījumi par to, kā notekūdeņos varētu noārdīt virsmaktīvās vielas un vai ar notekūdeņu attīrīšanu ir iespējams noārdīt nozarē izstrādātās jaunās ķīmiskās vielas. Lai to paveiktu, tika izmantoti bloku modeļi, kuru darbība atspoguļo divu galveno aerobās bioloģiskās notekūdeņu attīrīšanas veidu darbību (aktīvās dūņas un filtrēšana ar perkolēšanu vai pilināšanu). Katras jaunās ķīmiskās vielas izplatīšana un liela apjoma attīrīšanas iekārtu uzraudzība būtu bijusi nepraktiska un saistīta ar ļoti augstām izmaksām, pat ja tiktu īstenota vietējā līmenī.

SĀKOTNĒJIE APSVĒRUMI

Aktīvo dūņu bloki

- Aprakstītie aktīvo dūņu bloku modeļi ir tilpumā no 300 ml līdz aptuveni 2 000 ml. Daži no modeļiem bija tuvas imitācijas pilna izmēra iekārtām, kam ir dūņu nosēdztvertnes, no kurām nogulsējušās dūņas iesūkņā atpakaļ aerācijas tvertnē, savukārt citiem modeļiem nosēdztvertņu nebija, piemēram, Swisher (1). Iekārtas tilpumam jābūt piemērotam, proti, no vienas puses, tam jābūt pietiekami lielam, lai būtu iespējama sekmīga mehāniskā darbība un pietiekama daudzuma paraugu nodrošināšana, neietekmējot darbību, savukārt, no otras puses, tas nedrīkstētu būt tik liels, ka tam vajadzīga pārmēru liela telpa un pārāk daudz materiālu.

3. Plaši un ar apmierinošiem rezultātiem tiek izmantoti šādi divi iekārtu veidi: *Husmann* bloki (2) un porainā tīģeļa bloki (3) (4), no kuriem pirmo izmanto virsmaktīvo vielu izpētē; abu bloku darbība aprakstīta šajā testēšanas metodē. Tāpat ar apmierinošiem rezultātiem tiek izmantoti citi modeļi, piemēram, *Eckenfelder* (5). Šā imitācijas testa samērā augsto izmaksu un sarežģītības dēļ paralēli tika izskatīti vienkāršāki un lētāki skrīninga testi, kas ir ietverti šā pielikuma C.4.-A–C.4.-F nodaļā (6). Pieredze ar daudzām virsmaktīvajām vielām un ķīmiskajām vielām ir parādījusi, ka vielas, kas sekmīgi noārdījās skrīninga testos (viegli bionoārdāmas), noārdījās arī imitācijas testā. Dažas no vielām, kas nenoārdījās skrīninga testos, noārdījās potenciālās bionoārdīšanas testos (šā pielikuma C.12. nodaļa (7) un C.19. nodaļa (8)), taču tikai neliels skaits no minētās grupas vielām noārdījās imitācijas testā, savukārt ķīmiskās vielas, kuras nenoārdījās potenciālās bionoārdīšanas testos, nenoārdījās arī imitācijas testos (9) (10) (11).
4. Dažiem nolūkiem pietiek ar imitācijas testiem, kas veikti vienveidīgos darbības apstākļos, un rezultātus izsaka kā testējamās ķīmiskās vielas vai izšķīdušā organiskā oglekļa (turpmāk – *DOC*) noārdīšanās īpatsvaru. Šajā testēšanas metodē ir ietverts šāda testa apraksts. Tomēr pretēji šīs nodaļas iepriekšējai redakcijai, kurā bija aprakstīts tikai viens iekārtas veids, kas attīra sintētiskos notekūdeņus savienoto bloku režīmā, izmantojot samērā neprecīzu dūņu zuduma metodi, šajā tekstā ir piedāvātas vairākas variācijas. Ir aprakstītas iekārtas veida, darbības veida, notekūdeņu un dūņu zuduma noārdīšanas alternatīvas. Šis teksts ir ļoti līdzīgs ISO 11733 (12), ko sagatavošanas laikā rūpīgi pārskatīja, lai gan metodei nav piemērots starplaboratoriju salīdzinošais tests.
5. Citiem nolūkiem testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijai attīrītajā notekūdenī ir jābūt zināmai precīzāk, un tam ir vajadzīga plašāka metode. Piemēram, dūņu zudums ir jākontrolē precīzāk katru dienu un visā testēšanas laikā, un bloki ir jādarbina ar vairākiem dūņu zuduma režīmiem. Lai metode būtu pilnībā vispusīga, testēšana jāveic arī ar divām vai trijām atšķirīgām temperatūrām. Šādu metodi ir aprakstījis *Birch* (13) (14), un tā ir rezumēta 6. papildinājumā. Tomēr pašreizējās zināšanas nav pietiekamas, lai pieņemtu lēmumu par to, kurš no kinētikas modeļiem ir piemērojams ķīmisko vielu bionoārdīšanai notekūdeņu attīrīšanā un ūdens vidē vispār. *Monod* kinētikas piemērošana, kas sniegta kā piemērs 6. papildinājumā, ir attiecināma tikai uz ķīmiskajām vielām, kuru klātbūtne ir 1 mg/l vai vairāk, bet, pēc dažu iesaistīto personu domām, pat tas vēl ir jāpamato. Testi ar koncentrācijām, kas patiesāk atspoguļo koncentrācijas notekūdeņos, ir norādīti 7. papildinājumā, savukārt tādi testi kā 6. papildinājumā aprakstītais ir ietverti papildinājumos, nevis atsevišķā testēšanas metodē.

Filtri

6. Daudz mazāk uzmanības ir pievērsts perkolēšanas filtru modeļiem. Iespējams tādēļ, ka tie ir sarežģītāki un nav tik kompakti kā aktīvo dūņu iekārtu modeļi. *Gerike et al.* izstrādāja pīlināšanas filtra blokus un darbināja tos savienoto bloku režīmā (15). Šie filtri bija samēra lieli (augstums: 2 m; tilpums: 60 l), un katram bija vajadzīgi notekūdeņi 2 l/h apmērā. *Baumann et al.* (16) imitēja pīlināšanas filtrus, ievietojot poliestera “šķiedras” sloksnes 1 m caurulēs (iekšējais diametrs: 14 mm) pēc tam, kad šīs sloksnes bija 30 minūtes noturētas koncentrētās aktīvās dūņās. Vertikālā caurulē ievadīja testējamo ķīmisko vielu kā vienīgo oglekļa avotu minerālajū šķīdumā un bionoārdīšanas novērtēja ar *DOC* mērījumiem attīrītajā notekūdenī un CO_2 mērījumiem emitētajā gāzē.
7. Biofiltrus imitēja citādi (15). Rotējošās, nelielā leņķī slīpi attiecībā pret horizontāli novietotās caurulēs iepildīja notekūdeņus (apm. 250 ml/h) ar testējamo ķīmisko vielu un bez tās un savāktos attīrītos notekūdeņus analizēja, lai noteiktu *DOC* un/vai konkrēto testējamo ķīmisko vielu.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

8. Šī metode ir izstrādāta, lai ar to noteiktu ūdenī šķīstošu organisko ķīmisko vielu noārdīšanos un primāro un/vai galīgo bionoārdīšanos ar aerobajiem mikroorganismiem nepārtraukti darbinātā testēšanas sistēmā, kas imitē aktīvo dūņu procesu. Viegli bionoārdāma organiskā barotne un organiskās testējamās ķīmiskās vielas ir mikroorganismu oglekļa un enerģijas avots.
9. Paralēli identiskos apstākļos, ko izvēlas atbilstīgi testēšanas mērķim, tiek darbināti divi nepārtraukti strādājoši testēšanas bloki (aktīvo dūņu vai porainā tīģeļa). Parasti vidējais hidrauliskās aiztures laiks ir 6 h un vidējais dūņu vecums (dūņu aiztures laiks) ir 6–10 dienas. Dūņu zudumu nodrošina ar vienu no divām metodēm, proti, testējamo ķīmisko vielu parasti *DOC* koncentrācijā no 10 līdz 20 mg/l pievieno tikai viena bloka ieplūdei (organiskā barotne). Otru bloku izmanto kā kontroles bloku, lai noteiktu organiskās barotnes bionoārdīšanos.
10. Regulāri ņemtos attīrīto notekūdeņu paraugos, veicot konkrētu analīzi, nosaka *DOC*, kas ir vēlamāk, vai ķīmisko skābekļa patēriņu (turpmāk – *COD*) kopā ar testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju (ja vajadzīgs) attīrītajā notekūdenī no bloka, kurš saņem testējamo ķīmisko vielu. Pieņem, ka starpība starp *DOC* vai *COD* koncentrācijām attīrītajā notekūdenī testēšanas blokā un kontroles blokā ir attiecināma uz testējamo ķīmisko vielu vai tās organiskajiem metabolītiem. Šo starpību salīdzina ar *DOC* vai *COD* koncentrācijām ieplūdē pievienotās testējamās ķīmiskās vielas dēļ, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanos.

11. Bionoārdīšanas parasti var nošķirt no bioadsorbcijas, rūpīgi izpētot noārdīšanās un laika likni, un to parasti var apstiprināt, īstenojot vieglās bionoārdīšanas testu ar aklimatizētu sējmateriālu no bloka, kas saņem testējamo ķīmisko vielu.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

12. Ir jābūt zināmai testējamās ķīmiskās vielas tīrībai, šķīdībai ūdenī, gaistamībai un adsorbcijas īpašībām, lai būtu iespējams pareizi interpretēt iegūstamos rezultātus. Parasti gaistošas un nešķīstošas ķīmiskās vielas nevar testēt, ja vien netiek īstenoti īpaši piesardzības pasākumi (sk. 5. papildinājumu). Jābūt zināmai arī ķīmiskajai struktūrai vai vismaz empīriskajai formulai, lai būtu iespējams aprēķināt teorētiskās vērtības un/vai pārbaudīt parametru noteiktās vērtības, piemēram, teorētisko skābekļa patēriņu (turpmāk – *ThOD*), *DOC* un *COD*.
13. Piemērotāko testēšanas koncentrāciju izvēlei var būt noderīga informācija par testējamās ķīmiskās vielas toksisko iedarbību uz mikroorganismiem (sk. 4. papildinājumu), un tā var būt svarīga bionoārdīšanās spējas zemu vērtību pareizai interpretēšanai.

APSTIPRINĀŠANAI VAJADZĪGIE LĪMEŅI

14. Pirms virsmaktīvo vielu var laist tirgū, ar šā imitācijas (apstiprināšanas) testa sākotnēju piemērošanu virsmaktīvo vielu primārajai bionoārdīšanai ir jānoārda vairāk nekā 80 % no konkrētās ķīmiskās vielas. Ja netiek sasniegts 80 % līmenis, šo imitācijas (apstiprināšanas) testu var piemērot un virsmaktīvo vielu var laist tirgū tikai tad, ja vairāk nekā 90 % no konkrētās ķīmiskās vielas ir noārdīti. Attiecībā uz ķīmiskajām vielām parasti nav šaubu par sekmīgu vai nesekmīgu testēšanas rezultātu, un iegūto noārdīšanas īpatsvara vērtību var izmantot, lai aptuveni aprēķinātu iespējamo koncentrāciju vidē, ko var izmantot ķīmisko vielu radītā apdraudējuma novērtēšanā. Rezultāti parasti ir nešaubīgi. Vairākos pētījumos ar tīrām ķīmiskām vielām atklātais *DOC* noārdīšanās īpatsvars bija > 90 % vairāk nekā trīs ceturtdaļās gadījumu un > 80 % no vairāk nekā 90 % ķīmisko vielu, kas uzrādīja jebkādu būtisku bionoārdīšanās pakāpi.
15. Samērā mazs skaits ķīmisko vielu (piemēram, virsmaktīvo vielu) notekūdenī sasniedz koncentrācijas, ko izmanto šajā testā (apm. 10 mg C/l). Dažas ķīmiskās vielas šādās koncentrācijās var būt inhibējošas, savukārt citu noārdīšanās kinētika var atšķirties pie zemām koncentrācijām. Noārdīšanos var novērtēt precīzāk, izmantojot pielāgotas metodes, kurās izmanto reālistiski zemas testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas, un apkopotos datus varētu izmantot kinētikas konstanšu aprēķināšanā. Tomēr vajadzīgie testēšanas paņēmieni vēl nav pilnībā validēti, turklāt vēl nav noteikti kinētikas modeļi, kas apraksta bionoārdīšanās reakcijas (sk. 7. papildinājumu).

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

16. Lai nodrošinātu eksperimenta procedūras pareizu īstenošanu, dažreiz vienlaikus kopā ar testējamo ķīmisko vielu izpēti ir lietderīgi testēt testējamās ķīmiskās vielas, kuras ir zināmas. Šādas ķīmiskās vielas ietver adipīnskābi, 2-fenilfenolu, 1-naftolu, difēnskābi, 1-naftālskābi utt. (9) (10) (11).

TESTĒŠANAS REZULTĀTU ATKĀRTOJAMĪBA

17. Par imitācijas testiem ir pieejams mazāks skaits pētījumu pārskatu nekā par vieglās bionoārdīšanās testiem. Starp (vienlaicīgiem) replicējumiem pastāv laba atkārtojamība (10–15 %) attiecībā uz testējamām ķīmiskām vielām, kas noārdījušās 80 % vai vairāk apmērā, savukārt attiecībā uz ķīmiskām vielām, kuras noārdījušās sliktāk, pastāv lielāka mainība. Turklāt attiecībā uz dažām robežām tuvām ķīmiskajām vielām ir reģistrēti ļoti atšķirīgi rezultāti (piemēram, 10 %, 90 %) dažādos posmos testēšanas deviņu nedēļu laikā.
18. Starp rezultātiem, ko iegūst ar minētajiem diviem iekārtu veidiem, nav konstatētas lielas atšķirības, bet dažas ķīmiskās vielas ir uzrādījušas plašāku un konsekvētāku noārdīšanos sadzīves notekūdeņos nekā ESAO sintētiskajos notekūdeņos.

TESTĒŠANAS METODES APRAKSTS

Iekārta

Testēšanas sistēma

19. Vienas testējamās ķīmiskās vielas testēšanas sistēmu veido testēšanas bloks un kontroles bloks, taču, ja īsteno tikai konkrētas analīzes (primārā bionoārdīšanās), ir vajadzīgs tikai testēšanas bloks. Vienu kontroles bloku var izmantot vairākiem testēšanas blokiem vai nu ar tām pašām, vai citām testējamām ķīmiskām vielām. Savienoto bloku gadījumā (3. papildinājums) katram testēšanas blokam jābūt savam kontroles blokam. Testēšanas sistēma var būt vai nu aktīvo dūņu iekārtas modelis, *Husmann* bloks (1. papildinājuma 1. attēls), vai porainais tūgelis (1. papildinājuma 2. attēls). Abos gadījumos ir vajadzīgi pietiekami lieli glabāšanas trauki ieplūdēm un attīrītajiem notekūdeņiem, kā arī sūkņi ieplūdes dozēšanai vai nu kopā ar testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu, vai atsevišķi.

20. Katrs aktīvo dūņu iekārtas bloks sastāv no aerācijas trauka ar zināmu kapacitāti aptuveni 3 litru aktīvo dūņu apmērā un nostādināšanas trauka (sekundārais attīrītājs), kura tilpums ir aptuveni 1,5 litri. Tilpumus var nedaudz izmainīt, koriģējot nostādināšanas trauka augstumu. Ir pieļaujami dažāda izmēra trauki, ja tos darbina ar salīdzināmu hidraulisko noslodzi. Ja testēšanas telpā nav iespējams uzturēt temperatūru vēlamajā diapazonā, ir ieteicams izmantot traukus ar ūdens apvalku, kas nodrošina iespēju kontrolēt šā ūdens temperatūru. Lai atkārtoti apstrādātu aktīvās dūņas no nostādināšanas trauka aerācijas traukā, izmanto saspiesta gaisa sūkni vai dozētāj-sūkni vai nu nepārtraukti, vai periodiski vienādos intervālos.
21. Porainā tīģeļa sistēmu veido iekšējais, porainais cilindrs ar konusveida apakšu, kas ievietots nedaudz lielākā tādas pašas formas traukā, kurš izgatavots no necaurlaidīgas plastmasas. Poraino trauku var izgatavot no poraina polietilēna ar maksimālo poru izmēru 90 μm apmērā un biezumu 2 mm apmērā. Dūņu nodalīšanu no attīrītās organiskās barotnes nodrošina atšķirīga caurtece cauri porainajai sienai. Attīrītie notekūdeņi tiek savākti gredzenveidīgā telpā, no kuras tie pārplūst uz savākšanas trauku. Nenotiek nogulsņēšanās, tādēļ dūņas neatgriežas. Visu sistēmu var uzstādīt termostatējamā ūdens vannā. Porainie tīģeļi aizsprostojas, un sākotnējos posmos var notikt pārplūde. Tādā gadījumā ir jāaizvieto porainais ieliktnis ar tīru ieliktni, vispirms sifonējot dūņas no tīģeļa uz tīru spaini un izņemot aizsprostoto ieliktni. Pēc necaurlaidīgā ārējā cilindra izslaucīšanas jāieliek tīrs ieliktnis un dūņas jāievieto atpakaļ tīģeļī. Uzmanīgi tiek nokasītas un ievietotas atpakaļ dūņas arī no aizsprostotā ieliktna. Aizsprostotie tīģeļi ir jātīra, vispirms izmantojot mērenu ūdens strūklu, lai nomazgātu pārējās dūņas, un pēc tam mērcējot tos atšķaidītā nātrija hipohlorīta šķīdumā, pēc tam ūdenī, un pēc tam rūpīgi noskalojot ar ūdeni.
22. Dūņu aerācijai abu sistēmu aerācijas traukos ir vajadzīgi piemēroti paņēmieni, piemēram, poraina stikla kubi (difuzorie akmeņi) un saspiests gaiss. Gaisu attīra, ja vajadzīgs, laižot to cauri filtram un mazgājot. Sistēmai cauri ir jāizplūst pietiekami daudz gaisam, lai uzturētu aerobos apstākļus un visā testēšanas laikā suspendētu dūņu kopas.

Filtrācijas iekārta vai centrifūga

23. Iekārta paraugu filtrēšanai ar membrānas filtriem, kam ir pietiekama porainība (nominālais atvērums diametrs ir 0,45 μm) un kas adsorbē šķīstošas organiskās ķīmiskās vielas un nelielā mērā palaiž cauri organisko oglekli. Ja tiek izmantoti filtri, kas organisko oglekli neaiztur vispār, tie ir rūpīgi jānomazgā ar karstu ūdeni, lai nomazgātu noskalojamo organisko oglekli. Var izmantot arī centrifūgu, kas spēj nodrošināt 40 000 m/s².

Analītiskais aprīkojums

24. Iekārta, kas vajadzīga, lai noteiktu:

- DOC un kopējo organisko oglekli (turpmāk – TOC) vai COD,
- konkrētu ķīmisko vielu, ja vajadzīgs,
- suspendētās cietās daļiņas, pH, skābekļa koncentrāciju ūdenī,
- temperatūru, skābumu un sārmainību,
- amoniju, nitrītu un nitrātu, ja testēšanu veic nitrificējošos apstākļos.

Ūdens

25. Krāna ūdens, kurā DOC nepārsniedz 3 mg/l. Jānosaka sārmainība, ja nav jau zināma.
26. Dejonizēts ūdens, kurā DOC nepārsniedz 2 mg/l.

Organiskā barotne

27. Kā organiskā barotne ir pieļaujams sintētiskais notekūdens, sadzīves notekūdens vai abu maisījums. Ir pierādīts (11) (14), ka vienīgi sadzīves notekūdens izmantošana nereti uzrāda lielāku DOC noārdīšanās īpatsvaigu un pat pieļauj dažu tādu ķīmisko vielu noārdīšanos un bionoārdīšanos, kuras bioloģiski nenoārdās, izmantojot ESAO sintētisko notekūdeni. Turklāt sadzīves notekūdens nepārtraukta vai periodiska pievienošana nereti stabilizē aktīvās dūņas, arī to svarīgo spēju labi nogulsņēties. Tādējādi ir ieteicams izmantot sadzīves notekūdeni. DOC vai COD koncentrācija ir jānosaka katrā jaunā organiskās barotnes partijā. Organiskās barotnes skābumam un sārmainībai ir jābūt zināmai. Organiskajai barotnei var būt nepieciešams pievienot piemērotu buferšķīdumu (nātrija hidroģenkarbonātu vai kālija dihidroģenfosfātu), ja tai ir zems skābums vai sārmainība, lai testēšanas laikā aerācijas traukā pH uzturētu aptuveni 7,5 ± 0,5 apmērā. Lēmums par pievienojamā buferšķīduma tilpumu un pievienošanas laiku jāpieņem katrā gadījumā atsevišķi. Ja nepārtraukti vai periodiski tiek izmantoti maisījumi, maisījuma DOC (vai COD) jāuztur aptuveni nemainīgā vērtībā, piemēram, atšķaidot ar ūdeni.

Sintētiskais notekūdens

28. Jāšķidina litrā krāna ūdens: 160 mg peptona, 110 mg gaļas ekstrakta, 30 mg urīnvielas, 28 mg bezūdens dikālija hidroģēnfosfāta (K_2HPO_4), 7 mg nātrija hlorīda (NaCl), 4 mg kalcija hlorīda dihidrāta ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) un 2 mg magnija sulfāta heptahidrāta ($Mg_7SO_4 \cdot 7H_2O$). Šis ESAO sintētiskais notekūdens ir piemērs un paredz vidējo DOC koncentrāciju ieplūdē aptuveni 100 mg/l apmērā. Var izmantot arī citus savienojumus ar apmēram tādu pašu DOC koncentrāciju, kas tuvāk atspoguļo faktisko notekūdeni. Ja ir vajadzīga ieplūde ar mazāku koncentrāciju, sintētiskais notekūdens ir jāatšķaida, piemēram, 1:1, ar krāna ūdeni, lai iegūtu koncentrāciju aptuveni 50 mg/l apmērā. Šāda mazāk koncentrēta ieplūde ļaus labāk veidoties nitrificējošiem organismiem, un šādas izmaiņas ir jāpiemēro gadījumā, ja tiek pētīta nitrificējošu notekūdeņu attīrīšanas iekārtu imitācija. Šo sintētisko notekūdeni var izstrādāt destilētā ūdenī koncentrētā veidā un glabāt aptuveni 1 °C temperatūrā līdz pat vienai nedēļai. Kad vajadzīgs, jāatšķaida ar krāna ūdeni. (Šī barotne ir neapmierinoša, jo to raksturo, piemēram, ļoti augsta slāpekļa koncentrācija, samērā zems oglekļa saturs, bet nekas labāks nav atklāts, izņemot ieteikumu pievienot vairāk fosfātu kā buferšķīdumu un papildu peptonu.)

Sadzīves notekūdens

29. Jāizmanto svaigs, nogulsņējies notekūdens, kas iegūts ikdienas attīrīšanas darbos, kuros galvenokārt saņem sadzīves notekūdeni. Tas jāsavāc pirms nogulsšanās no primārās pārplūdes kanāla nosēdvertnes vai no barotnes aktīvo dūņu iekārtai, un tam lielākoties jābūt bez rupjām daļiņām. Notekūdeni var izmantot pēc vairāku dienu glabāšanas (bet parasti tai nevajadzētu pārsniegt septiņas dienas) aptuveni 4 °C, ja tiek nodrošināts, ka glabāšanas laikā būtiski nesamazinās DOC (vai COD) (t. i., mazāk kā par 20 %). Lai ierobežotu sistēmas traucējumus, pirms izmantošanas katras jaunas partijas DOC (vai COD) ir jāpielāgo atbilstīgai nemainīgai vērtībai, piemēram, atšķaidot ar krāna ūdeni.

Aktīvās dūņas

30. Aktīvās dūņas sējmateriālam ir jāsavāc no atbilstīgi funkcionējošas notekūdeņu attīrīšanas iekārtas aerācijas tvertnes vai no laboratorijas aktīvo dūņu bloka, kas galvenokārt attīra sadzīves notekūdeni.

Testējamo ķīmisko vielu rezerves šķīdumi

31. Ķīmiskajām vielām ar pietiekamu šķīdību jāgatavo rezerves šķīdumi dejonizētā ūdenī vai sintētiskā notekūdens minerālbarotnē, nodrošinot atbilstīgas koncentrācijas (piemēram, 1–5 g/l) (attiecībā uz nešķīstošām un gaistošām ķīmiskajām vielām sk. 5. papildinājumu). Jānosaka rezerves šķīduma DOC un TOC, un mērījumi jāatkārto katrai jaunai partijai. Ja atšķirība starp DOC un TOC pārsniedz 20 %, jāpārbauda testējamās ķīmiskās vielas šķīdība ūdenī. Jāsalīdzina DOC vai testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, mērījumus izdarot ar rezerves šķīduma īpašu analīzi, ar nominālo vērtību, lai noskaidrotu, vai atgūšana ir pietiekami laba (parasti var paredzēt > 90 %). Jānoskaidro, it sevišķi attiecībā uz dispersijām, vai DOC var vai nevar izmantot kā analītisku parametru vai arī var izmantot vienīgi kā analītisku paņēmieni, kas piemērots testējamai ķīmiskajai vielai. Dispersijām ir vajadzīga paraugu centrifugēšana. Katrā jaunā partijā ir jānosaka DOC, COD vai testējamā ķīmiskā viela, veicot īpašu analīzi.
32. Jānosaka rezerves šķīduma pH. Galējas vērtības norāda, ka ķīmiskās vielas pievienošana, iespējams, ietekmē aktīvo dūņu pH testēšanas sistēmā. Tādā gadījumā rezerves šķīdums ir jāneitralizē, lai iegūtu pH $7 \pm 0,5$ apmērā, izmantojot neredz neorganiskās skābes vai bāzes, bet izvairoties no testējamās ķīmiskās vielas nogulsšanās.

PROCEDŪRA

33. Procedūra ir aprakstīta aktīvo dūņu iekārtu blokiem. Porainā tīģeļa sistēmai procedūra ir nedaudz jāpielāgo.

Sējmateriāla sagatavošana

34. Testēšanas sistēmas sējmateriāls ir jānodrošina testēšanas sākumā vai nu ar aktīvajām dūņām, vai ar sējmateriālu, kas satur mikroorganismus zemā koncentrācijā. Sējmateriāls jāglabā un jāpiesātina ar gaisu istabas temperatūrā līdz tā izmantošanai un jāizmanto 24 h laikā. Pirmajā minētajā gadījumā jāņem aktīvo dūņu paraugs no efektīvi funkcionējošas bioloģiskās notekūdeņu attīrīšanas iekārtas vai laboratorijas attīrīšanas iekārtas, kas galvenokārt saņem sadzīves notekūdeni, aerācijas tvertnes. Ja ir jāimitē nitrificēšanas apstākļi, dūņas ir jāņem no nitrificējošas notekūdeņu attīrīšanas iekārtas. Jānosaka suspendēto cieto daļiņu koncentrācija, un, ja vajadzīgs, jāpalielina dūņu koncentrācija, ļaujot tām nogulsnēties, lai testēšanas sistēmai tiktu pievienots pēc iespējas mazāks daudzums. Jānodrošina, lai sausnas satura sākuma koncentrācija būtu aptuveni 2,5 g/l.
35. Otrajā minētajā gadījumā par sējmateriālu jāizmanto attīrīts notekūdens 2–10 ml/l apmērā no sadzīves bioloģiskās notekūdeņu attīrīšanas iekārtas. Lai iegūtu pēc iespējas plašāku baktēriju sugu daudzveidību, var būt lietderīgi pievienot sējmateriālu no dažādiem citiem avotiem, piemēram, virszemes ūdens. Tādā gadījumā aktīvās dūņas izveidosies un attīstīsies testēšanas sistēmā.

Organiskās barotnes dozēšana

36. Jānodrošina, ka gan testēšanas sākumā, gan laikā ieklūdes un attīrītā notekūdens tvertnes, kā arī caurules no ieklūdes tvertnēm un uz attīrītā notekūdens tvertnēm tiek rūpīgi iztīrītas, lai nomazgātu mikrobu kolonijas. Testēšanas sistēmas ir jāmontē termostātējamā telpā (parasti 20–25 °C diapazonā), vai jāizmanto ar ūdens apvaku nodrošināti testēšanas bloki. Jāsagatavo vajadzīgās organiskās barotnes pietiekams tilpums (27.–29. punkts). Sākumā aerācijas trauks un nostādināšanas trauks jāpiepilda ar organisko barotni un jāpievieno sējmatēriāls (34. un 35. punkts). Jāsāk tāda aerācija, kas uzturētu dūņu suspensiju un aerāciju, un jāsāk ieklūdes dozēšana un nogulsņējušo dūņu atkārtota apstrāde. Organiskā barotne ir devās jāizvada no testēšanas un kontroles bloku glabāšanas traukiem uz aerācijas traukiem (20. un 21. punkts), un jāsavāc attiecīgie attīrītie notekūdeņi līdzīgos glabāšanas traukos. Lai iegūtu parasto hidroaiztures laiku 6 stundu apmērā, organisko barotni sūknē ar ātrumu 0,5 l/h. Lai apstiprinātu šo ātrumu, jāizmēra organiskās barotnes dienā dozētais daudzums, atzīmējot barotnes tilpuma samazinājumu glabāšanas traukos. Lai noteiktu ķīmisko vielu periodiskas un vienreizējas pievienošanas ietekmi, būs vajadzīgi citi dozēšanas režīmi.
37. Ja organisko barotni sagatavo izmantošanai periodā, kas pārsniedz vienu dienu, ir vajadzīga dzerēšana 4 °C vai citas piemērotas uzglabāšanas metodes, lai novērstu mikrobu vairošanos un bionoārdīšanas ārpus testēšanas blokiem (29. punkts). Ja izmanto sintētisko notekūdeni, ir iespējams sagatavot un 4 °C uzglabāt koncentrētu rezerves šķīdumu (piemēram, 10 reizes lielāku koncentrāciju par parasto, 28. punkts). Šo rezerves šķīdumu pirms lietošanas var kārtīgi samaisīt ar atbilstīgu daudzumu krāna ūdens. To var arī tieši iesūknēt, atsevišķi iesūknējot atbilstīgu daudzumu krāna ūdens.

Testējamās ķīmiskās vielas dozēšana

38. Ieklūdes glabāšanas traukam jāpievieno testējamās ķīmiskās vielas rezerves šķīduma atbilstīgs daudzums (31. punkts), vai arī tas tieši jādozē ar atsevišķu sūkni aerācijas traukā. Parasti vidējai testēšanas DOC koncentrācijai ieklūdē jābūt 10–20 mg/l diapazonā, un augstākā koncentrācija nedrīkst pārsniegt 50 mg/l. Ja testējamā ķīmiskā viela ir ūdenī mazšķīstoša vai ja ir iespējama toksiska iedarbība, DOC koncentrācija jāsamazina līdz 5 mg/l vai mazāk, bet tikai tad, ja ir pieejama un tiek īstenota piemērota konkrēta analītiskā metode (dispersētas testējamās ķīmiskās vielas, kas ir ūdenī mazšķīstošas, var pievienot, izmantojot īpašus dozēšanas paņēmienus, sk. 5. papildinājumu).
39. Pēc laikposma, kurā sistēma ir nostabilizējusies un sākuši efektīvi (apm. 80 %) noārdīt organiskās barotnes DOC, jāsāk pievienot testējamā ķīmiskā viela. Ir svarīgi pārliecināties, ka visi bloki darbojas vienlīdz efektīvi, pirms tiek pievienota testējamā ķīmiskā viela. Ja tie tā nedarbojas, situāciju parasti var atrisināt, sajaucot atsevišķu bloku dūņas un tās atkārtoti sadalot vienādos daudzumos pa blokiem. Ja izmanto aktīvo dūņu sējmatēriālu (aptuveni) 2,5 g/l (saussvārs) apmērā, testējamo ķīmisko vielu var pievienot jau no testēšanas sākuma, jo pieaugošu daudzumu tieša pievienošana no paša sākuma nodrošina priekšrocību, ka aktīvās dūņas varēs labāk pielāgoties testējamajai ķīmiskajai vielai. Neatkarīgi no testējamās ķīmiskās vielas pievienošanas veida ir ieteicams regulāros intervālos mērīt attiecīgo plūsmas ātrumu un/vai tilpumus glabāšanas traukā(-os).

Aktīvo dūņu apstrāde

40. Aktīvo dūņu cieto daļiņu koncentrācija testēšanas laikā parasti stabilizējas normas robežās neatkarīgi no izmantotā sējmatēriāla 1–3 g/l (saussvārs) apmērā atkarībā no organiskās barotnes kvalitātes un koncentrācijas, darbības apstākļiem, klātesošo mikroorganismu veida un testējamās ķīmiskās vielas ietekmes.
41. Ir vai nu jānosaka suspendētās cietās daļiņas aerācijas traukos vismaz reizi nedēļā un jāatbrīvojas no atlikušajām dūņām, lai uzturētu koncentrāciju 1–3 g/l diapazonā (saussvārs), vai jākontrolē vidējais dūņu vecums nemainīgā vērtībā parasti 6–10 dienu diapazonā. Ja, piemēram, izvēlas astoņu dienu dūņu aiztures laiku, katru dienu no aerācijas trauka ir jāizņem 1/8 aktīvo dūņu daudzuma un jāatbrīvojas no tās. Tas jāveic katru dienu vai, vēlams, ar automātisku periodiski darbojošos sūkni. Suspendēto cieto daļiņu nemainīgas vai gandrīz nemainīgas koncentrācijas uzturēšana nenodrošina nemainīgu dūņu aiztures laiku, kas ir darbības mainīgais lielums, kurš nosaka testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas vērtību attīrītājā notekūdenī.
42. Testēšanas laikā vismaz reizi dienā jānoņem dūņas, kas pielīpušas aerācijas trauka un nostādināšanas trauka sienām, lai tās tiktu atkārtoti suspendētas. Regulāri jāpārbauda un jāiztīra visas caurules, lai novērstu bioplēves augšanu. Nogulsņējušās dūņas no nostādināšanas trauka ir atkārtoti jāapstrādā aerācijas traukā, vēlams, ar periodisku sūknēšanu. Porainā tīģeļa sistēmā atkārtota apstrāde nenotiek, bet ir jānodrošina, ka, pirms traukā būtiski pieaug tilpums, tiek ievietoti tīri iekšējie tīģeļi (21. punkts).
43. Husmann iekārtas blokiem var būt raksturīga slikta dūņu nogulsņēšanās un zudums. To var novērst, paralēli izmantojot vienu vai vairākus turpmāk norādītos paņēmienus testēšanas un kontroles blokos:

- regulāros intervālos, piemēram, reizi nedēļā, var pievienot svaigas dūņas vai flokulantu (piemēram, 2 ml/trauku 50 g/l FeCl_3), bet ir jāpārlicinās, ka nav nekādas testējamās ķīmiskās vielas reakcijas vai nogulsņēšanās FeCl_3 ietekmē,
- saspiesta gaisa sūkni var aizvietot ar peristaltisko sūkni, tādējādi nodrošinot dūņu recirkulācijas plūsmu, kas aptuveni atbilst izmantojamai ieplūdes plūsmai, un ļaujot nogulsņējušās dūņas izveidoties anaerobai zonai (saspiesta gaisa sūkņa ģeometrija ierobežo atgrieztu dūņu minimālo plūsmas ātrumu apmērā, kas ir aptuveni 12 reizes lielāks par ieplūdes ātrumu),
- dūņas no nostādināšanas trauka uz aerācijas trauku var sūknēt periodiski (piemēram, 5 minūtes reizi 2,5 stundās, lai atkārtoti apstrādātu 1–1,5 l/h),
- var izmantot netoksisku pretputošanas līdzekli minimālā koncentrācijā, lai novērstu putu radītos zaudējumus (piemēram, silikoneļļu),
- gaisu caur dūņām nostādināšanas traukā var laist īsos, pēkšņos pūtienos (piemēram, 10 sekundes reizi stundā),
- arī organisko barotni var intervālos dozēt aerācijas traukā (piemēram, 3–10 minūtes reizi stundā).

Paraugu ņemšana un analīze

44. Regulāros intervālos ir jāizmēra aerācijas traukā esošo aktīvo dūņu izšķīdušā oglekļa koncentrācija, temperatūra un pH vērtība. Jānodrošina, lai vienmēr būtu pieejams pietiekami daudz skābekļa ($> 2 \text{ mg/l}$) un lai temperatūra tiktu uzturēta vajadzīgajā diapazonā (parasti $20\text{--}25^\circ\text{C}$). pH ir jāuztur $7,5 \pm 0,5$ apmērā, aerācijas traukā vai ieplūdē dozējot nelielus daudzumus neorganiskās bāzes vai skābes vai palielinot organiskās barotnes buferjspēju (sk. 27. punktu). Nitrificēšanas laikā veidojas skābe, 1 mg N oksidācija rada aptuveni 7 mg CO_3^- . Mērījumu regularitāte ir atkarīga no mēramā parametru sistēmas stabilitātes un var būt atšķirīga starp dienas un nedēļas mērījumiem.
45. Jāizmēra DOC vai COD kontroles un testēšanas trauku ieplūdēs. Jāizmēra testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas ieplūdē, veicot īpašu analīzi vai izdarot aplēses no koncentrācijas rezerves šķīdumā (31. punkts), izmantotā tilpuma un testēšanas blokā dozētā notekūdens daudzuma. Ieteicams aprēķināt testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju, lai samazinātu koncentrācijas datu mainību.
46. Jāpaņem piemēroti paraugi no savāktā attīrītā notekūdens (piemēram, 24 h maisījumi) un jāfiltrē cauri membrānai ar poru izmēru $0,45 \mu\text{m}$ apmērā vai jācentrifugē aptuveni $40\,000 \text{ m/s}^2$ ātrumā kādas 15 minūtes. Centrifugēšana jāizmanto gadījumā, ja filtrēšana ir apgrūtināta. Vismaz divas reizes ir jānosaka DOC vai COD, lai izmērītu galīgo bionoārdīšanos un, ja vajadzīgs, primāro bionoārdīšanos, veicot testējamai ķīmiskajai vielai piemērotu analīzi.
47. COD izmantošana pie zemām koncentrācijām var radīt analītiskas problēmas, tāpēc to ieteicams izmantot tikai tad, ja ir izmantota pietiekami augsta testēšanas koncentrācija (aptuveni 30 mg/l). Turklāt ķīmiskajām vielām ar augstu adsorbciiju ir ieteicams dūņas adsorbētās ķīmiskās vielas daudzumu mērīt, izmantojot testējamai ķīmiskajai vielai piemērotu analītisko paņēmieni.
48. Paraugu ņemšanas regularitāte ir atkarīga no paredzētā testēšanas ilguma. Ieteicamā regularitāte ir trīs reizes nedēļā. Tiklīdz bloki efektīvi darbojas, jānogaida viena līdz ne vairāk kā sešas nedēļas pēc testējamās ķīmiskās vielas pievienošanas, lai pielāgošanās sasniegtu stabilu stāvokli. Vēlams iegūt vismaz 15 derīgas vērtības plato fāzē (59. punkts), kas parasti ilgst trīs nedēļas, lai novērtētu testēšanas rezultātus. Testēšanu var beigt, ja ir sasniegta pietiekama noārdīšanas pakāpe (piemēram, $> 90\%$) un ja ir pieejamas šīs 15 vērtības, kas atspoguļo trīs nedēļas katru darbdienā veiktās analīzes. Parasti testēšanas ilgums nedrīkstētu pārsniegt 12 nedēļas pēc testējamās ķīmiskās vielas pievienošanas.
49. Ja dūņas nitrificējas un ja ir jāizpēta testējamās ķīmiskās vielas ietekme uz nitrificēšanos, vismaz reizi nedēļā ir jāanalizē paraugi no testēšanas un kontroles bloku attīrītā notekūdens, lai konstatētu amoniju un/vai nitrītu kopā ar nitrātu.
50. Visas analīzes ir jāveic pēc iespējas ātrāk, it sevišķi, ja nosaka slāpekli. Ja analīzes ir jāatliek, paraugi ir jāglabā pilnās, cieši aizvākotās pudelēs 4°C un tumsā. Ja paraugi ir jāglabā vairāk nekā 48 h, tie jāuzglabā dziļi saldēti, ar paskābināšanu (piemēram, 10 ml/l no 400 g/l sērskābes šķīduma) vai pievienojot piemērotu toksisku vielu (piemēram, 20 ml/l no 10 g/l dzīvsudraba (II) hlorīda šķīduma). Ir jānodrošina, ka uzglabāšanas paņēmieni neietekmē analīzes rezultātus.

Testēšanas bloku savienošana

51. Ja izmantos savienošanu (3. papildinājums), katru dienu ir jāapmaina vienāds daudzums aktīvo dūņu (150–1 500 ml aerācijas traukiem, kas satur trīs litrus šķidruma) starp testēšanas bloka un tā kontroles bloka aerācijas traukiem. Ja testējamā ķīmiskā viela spēcīgi adsorbējas uz dūņām, jānomaina vienīgi nostādināšanas trauku dzidrais šķidrums. Abos gadījumos ir jāizmanto korekcijas koeficients, lai aprēķinātu testēšanas rezultātus (55. punkts).

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

52. Jāaprēķina testējamās ķīmiskās vielas *DOC* vai *COD* noārdīšanās īpatsvars katrā plānotajā novērtējumā, izmantojot šādu vienādojumu:

$$D_t = \frac{C_s - (E - E_0)}{C_s} \times 100$$

kur:

D_t = *DOC* vai *COD* noārdīšanās % laikā t ;

C_s = *DOC* vai *COD* ieplūdē testējamās ķīmiskās vielas dēļ, ko ieteicams aplēst no rezerves šķidruma (mg/l);

E = izmērītā *DOC* vai *COD* vērtība testēšanas bloka attīrītajā notekūdenī laikā t (mg/l);

E_0 = izmērītā *DOC* vai *COD* vērtība kontroles bloka attīrītajā notekūdenī laikā t (mg/l).

53. Organiskās barotnes *DOC* vai *COD* noārdīšanās kontroles blokā ir lietderīga informācija, lai novērtētu aktīvo dūņu bionārdīšanās aktivitāti testēšanas laikā. Noārdīšanās īpatsvars ir jāaprēķina pēc vienādojuma:

$$D_B = \frac{C_M - E_0}{C_M} \times 100$$

kur:

D_B = organiskās barotnes *DOC* vai *COD* noārdīšanās % kontroles blokā laikā t ;

C_M = organiskās barotnes *DOC* vai *COD* kontroles ieplūdē (mg/l).

Nav obligāti, bet var arī aprēķināt *DOC* vai *COD* noārdīšanās īpatsvaru organiskās barotnes dēļ kopā ar testējamo ķīmisko vielu testēšanas blokā pēc vienādojuma:

$$D_T = \frac{C_T - E}{C_T} \times 100$$

kur:

D_T = kopējās testēšanas ieplūdes *DOC* vai *COD* noārdīšanās %;

C_T = kopējās testēšanas ieplūdes *DOC* vai *COD* vai *DOC* vai *COD*, kas aprēķināts no rezerves šķidrumiem (mg/l).

54. Jāaprēķina testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās, ja tā ir izmērīta ar konkrētu analītisko metodi katra plānotā novērtējuma laikā pēc vienādojuma:

$$D_{ST} = \frac{S_i - S_e}{S_i} \times 100$$

kur:

D_{ST} = testējamās ķīmiskās vielas primārās noārdīšanās % laikā t ;

S_i = izmērītā vai aplēstā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas ieplūdē (mg/l);

S_e = izmērītā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas attīrītajā notekūdenī (mg/l).

55. Ja ir izmantots savienošanas režīms, testējamās ķīmiskās vielas atšķaidīšanās aerācijas traukā ir jākompensē ar dūņu apmaiņu, izmantojot korekcijas koeficientu (sk. 3. papildinājumu). Ja ir izmantots vidējais hidrauliskās aiztures laiks 6 h apmērā un ja ir apmainīta puse no aktīvo dūņu daudzuma aerācijas traukā, noteiktās dienas noārdīšanās vērtības (D_t , 52. punkts) ir jākorrigē, lai iegūtu testējamās ķīmiskās vielas patieso noārdīšanās pakāpi D_{tc} ar vienādojumu:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

Testēšanas rezultātu izteikšana

56. Ir grafiski jāattēlo noārdīšanās īpatsvars D_t (vai D_{tc}) un D_{st} , ja pieejams, attiecībā pret laiku (sk. 2. papildinājumu). No testējamās ķīmiskās vielas (*per se* vai kā DOC) noārdīšanās līknes formas var izdarīt dažus secinājumus par noārdīšanas procesu.

Adsorbcija

57. Ja ir novērota testējamās ķīmiskās vielas DOC augsta noārdīšanās pakāpe testēšanas sākumā, testējamā ķīmiskā viela, iespējams, tiek noārdīta ar adsorbciju uz aktīvo dūņu cietajām daļiņām. To ir iespējams pierādīt, nosakot adsorbēto testējamo ķīmisko vielu ar īpašu analīzi. Parasti adsorbējamu ķīmisko vielu DOC noārdīšanās pakāpe nesaglabājas augsta visā testēšanas laikā, proti, parasti noārdīšanās pakāpe ir augsta sākumā un pēc tam tā pakāpeniski samazinās līdz līdzsvara vērtībai. Ja tomēr adsorbējamā testējamā ķīmiskā viela kaut kādā veidā spēja izraisīt mikrobu populācijas aklimatizāciju, testējamās ķīmiskās vielas DOC noārdīšanās pēc tam pieaugtu un sasniegtu augstu plato vērtību.

Kavējuma fāze

58. Tāpat kā statiskos, arī skrīninga testos daudzām testējamām ķīmiskajām vielām ir vajadzīga kavējuma fāze, pirms notiek pilnīga bionoārdīšanās. Kavējuma fāzē noārdošo baktēriju aklimatizācija vai pielāgošanās notiek, testējamai ķīmiskajai vielai gandrīz nemaz nenoārdoties, savukārt tad sākas šo baktēriju vairošanās. Šī fāze beidzas, un noārdīšanās fāze sākas brīdī, kad ir noārdījušies aptuveni 10 % no testējamās ķīmiskās vielas sākotnējā daudzuma (pēc adsorbcijas, ja tāda notiek). Kavējuma fāze nereti ir ļoti mainīgs rādītājs, kam ir slikta atkārtojamība.

Plato fāze

59. Nepārtrauktas testēšanas noārdīšanās līknes plato fāzi definē kā fāzi, kurā notiek vislielākā noārdīšanās. Plato fāzei jāilgst vismaz trīs nedēļas un jābūt aptuveni 15 izmērītām derīgām vērtībām.

Testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās vidējā pakāpe

60. Jāaprēķina vidējā vērtība no testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās vērtībām (D_t) plato fāzē. Noapaļojot to līdz tuvākajam veselajam skaitlim (1 %), iegūst testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās pakāpi. Ieteicams arī aprēķināt vidējās vērtības 95 % ticamības intervālu.

Organiskās barotnes noārdīšanās

61. Ir grafiski jāattēlo organiskās barotnes DOC vai COD noārdīšanās īpatsvars kontroles blokā (D_B) attiecībā pret laiku. Jānorāda noārdīšanās vidējā pakāpe, kuru aprēķina tāpat kā testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās pakāpi (60. punkts).

Norādes par bionoārdīšanos

62. Ja testējamā ķīmiskā viela būtiski neadsorbējas uz aktīvajām dūņām un ja noārdīšanās līknei ir tipiska bionoārdīšanās līknes forma ar kavējuma, noārdīšanās un plato fāzēm (58. un 59. punkts), izmērīto noārdīšanos var droši attiecināt uz bionoārdīšanos. Ja sākumā ir novērota augsta noārdīšanās pakāpe, imitācijas testā nevar nošķirt bioloģiskos un abiotiskos noārdīšanās procesus. Šādos gadījumos un gadījumos, kad pastāv šaubas par bionoārdīšanos (piemēram, ja notiek atdalīšanās), ir jāanalizē adsorbētās testējamās ķīmiskās vielas vai jāveic papildu statistiskie bionoārdīšanās testi, pamatojoties uz parametriem, kas skaidri uzrāda bioloģiskus procesus. Šādi testi ietver skābekļa uzņemšanas metodes (šā pielikuma C.4.-D, C.4.-E un C.4.-F nodaļa (6)) vai testēšanu ar oglekļa dioksīda veidošanās mērīšanu (šā pielikuma C.4.-C nodaļa (6)), vai ISO brīvā tilpuma metodi (18), izmantojot iepriekš eksponētu sējmateriālu no imitācijas testa. Ja ir izmērīta gan DOC, gan konkrētas ķīmiskās vielas noārdīšanās, būtiskas atšķirības (pirmā minētā ir zemāka par otro) starp noārdīšanās īpatsvariem norāda uz organisku starpproduktu klātbūtni attīrītajos notekūdeņos, kurus, iespējams, ir grūtāk noārdīt nekā ķīmisko pamatvielu.

Testēšanas rezultātu derīgums

63. Informācija par sējmateriāla normālu bionoārdīšanos ir iegūta, ja ir noteikta organiskās barotnes noārdīšanās pakāpe (53. punkts) kontroles blokā. Testēšanu uzskata par derīgu, ja *DOC* vai *COD* noārdīšanās pakāpe kontroles blokā(-os) ir > 80 % pēc divām nedēļām un ja nav iegūti neparasti novērojumi.
64. Ja ir izmantota viegli bionoārdāma (atsauce) ķīmiskā viela, bionoārdīšanās pakāpei (D_t , 52. punkts) jābūt > 90 %.
65. Ja testēšanu veic nitrificējošos apstākļos, vidējai koncentrācijai attīrītajos notekūdeņos jābūt < 1 mg/l amonjakam-N un < 2 mg/l nitrītam-N.
66. Ja nav atbilstības šiem kritērijiem (63.–65. punkts), testēšana ir jāatkārto ar sējmateriālu no cita avota, ir jātestē ķīmiskā standartviela un ir jāpārskata visas testēšanas procedūras.

Testēšanas pārskats

67. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela:

- identifikācijas dati,
- fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikālās un ķīmiskās īpašības.

Testēšanas apstākļi:

- testa sistēmas veids un jebkādas izmaiņas, lai testētu nešķīstošas un gaistošas ķīmiskās vielas,
- organiskās barotnes veids,
- rūpniecisko notekūdeņu daļa un veids notekūdeņos, ja tas ir zināms,
- sējmateriāls, īpašības un paraugu ņemšanas vieta(-as), koncentrācija un jebkāda iepriekšēja apstrāde,
- testējamās ķīmiskās vielas rezerves šķīdums – *DOC* un *TOC* saturs, sagatavošanas veids, ja tā ir suspensija, izmantotā testēšanas koncentrācija, pamatojums, ja *DOC* ir ārpus 10–20 mg/l diapazona, pievienošanas metode, pirmās pievienošanas datums, jebkādas izmaiņas,
- vidējais dūņu vecums un vidējais hidrauliskās aiztures laiks, dūņu zuduma metode, apjoma palielināšanās novēršanas metode, dūņu zudums utt.,
- izmantotie analītiskie paņēmieni,
- testēšanas temperatūra,
- dūņu apjoma palielināšanās īpašības, dūņu daudzuma indekss (turpmāk – *SVI*), maisījumā suspendētās cietās daļiņas (turpmāk – *MLSS*),
- jebkādas novirzes no standarta procedūrām un jebkādi apstākļi, kas, iespējams, ir ietekmējuši rezultātus.

Testēšanas rezultāti:

- visi izmērītie dati (*DOC*, *COD*, īpašās analīzes, pH, temperatūra, skābekļa koncentrācija, suspendētās cietās daļiņas, N ķīmiskās vielas, ja vajadzīgs,
- visas aprēķinātās D_t (vai D_{10}), D_B un D_{St} vērtības tabulas formātā un noārdīšanās līknes,
- informācija par kavējuma un plato fāzēm, testēšanas ilgumu, testējamās ķīmiskās vielas un organiskās barotnes noārdīšanās pakāpi kontroles blokā kopā ar statistikas informāciju un paziņojumiem par bionoārdīšanos un testēšanas derīgumu,
- rezultātu apspriešana.

LITERATŪRA

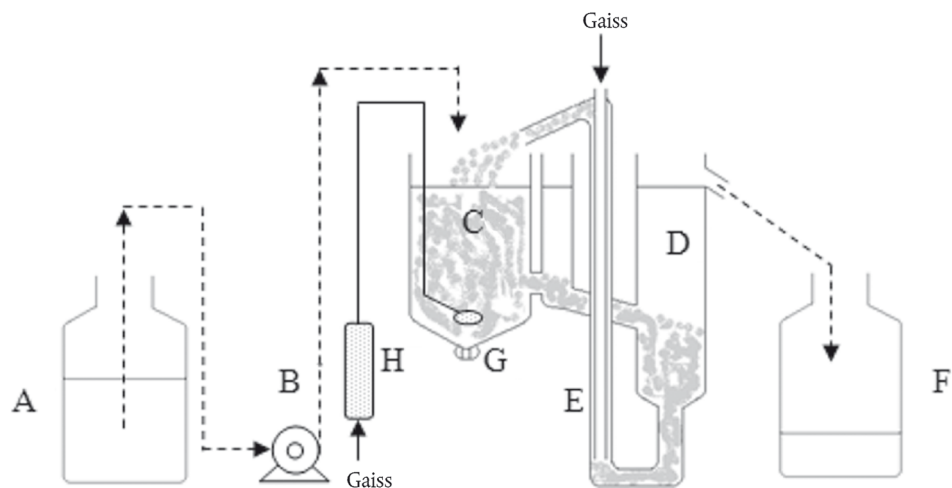
- (1) Swisher RD (1987). "Surfactant Biodegradation", 2nd Edn. Marcel Dekker Inc. New York, 1085 pp.
 - (2) German Government (1962). Ordinance of the degradability of detergents in washing and cleaning agents. Bundesgesetzblatt, Pt.1 No.49: 698-706.
 - (3) Painter HA and King EF (1978a). WRc porous-pot 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) Šā pielikuma C.4. nodaļa "Viegļas bionoārdīšanās spējas noteikšana".
 - (7) Šā pielikuma C.12. nodaļa "Biodegradācija – modificēts SCAS tests".
 - (8) Šā pielikuma C.19. nodaļa "Adsorbcijas koeficienta (K_{OC}) noteikšana uz augsnes un uz kanalizācijas nosēdumiem ar augstas izšķiršanas šķidruma hromatogrāfiju (HPLC).
 - (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 Jornado 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. 91-98 pp. 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.
-

1. papildinājums

1. attēls

Bionoārdīšanās novērtējumā izmantotais aprīkojums

Husmann bloks

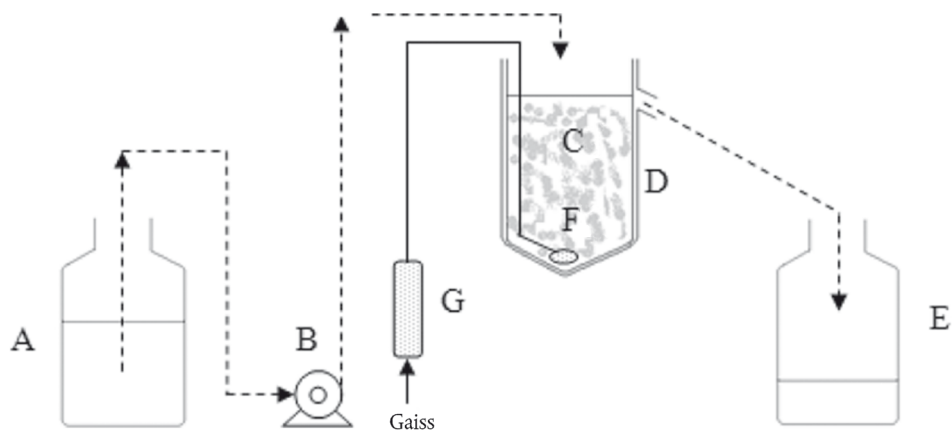


- | | |
|--------------------------------------|---------------------------|
| A. Glabāšanas trauks | E. Saspiesta gaisa sūknis |
| B. Dozētājsūknis | F. Savākšanas trauks |
| C. Aerācijas kamera (3 l kapacitāte) | G. Aerators |
| D. Nostādīšanas trauks | H. Gaisa plūsmas mēritājs |

2. attēls

Bionoārdīšanās novērtējumā izmantotais aprīkojums

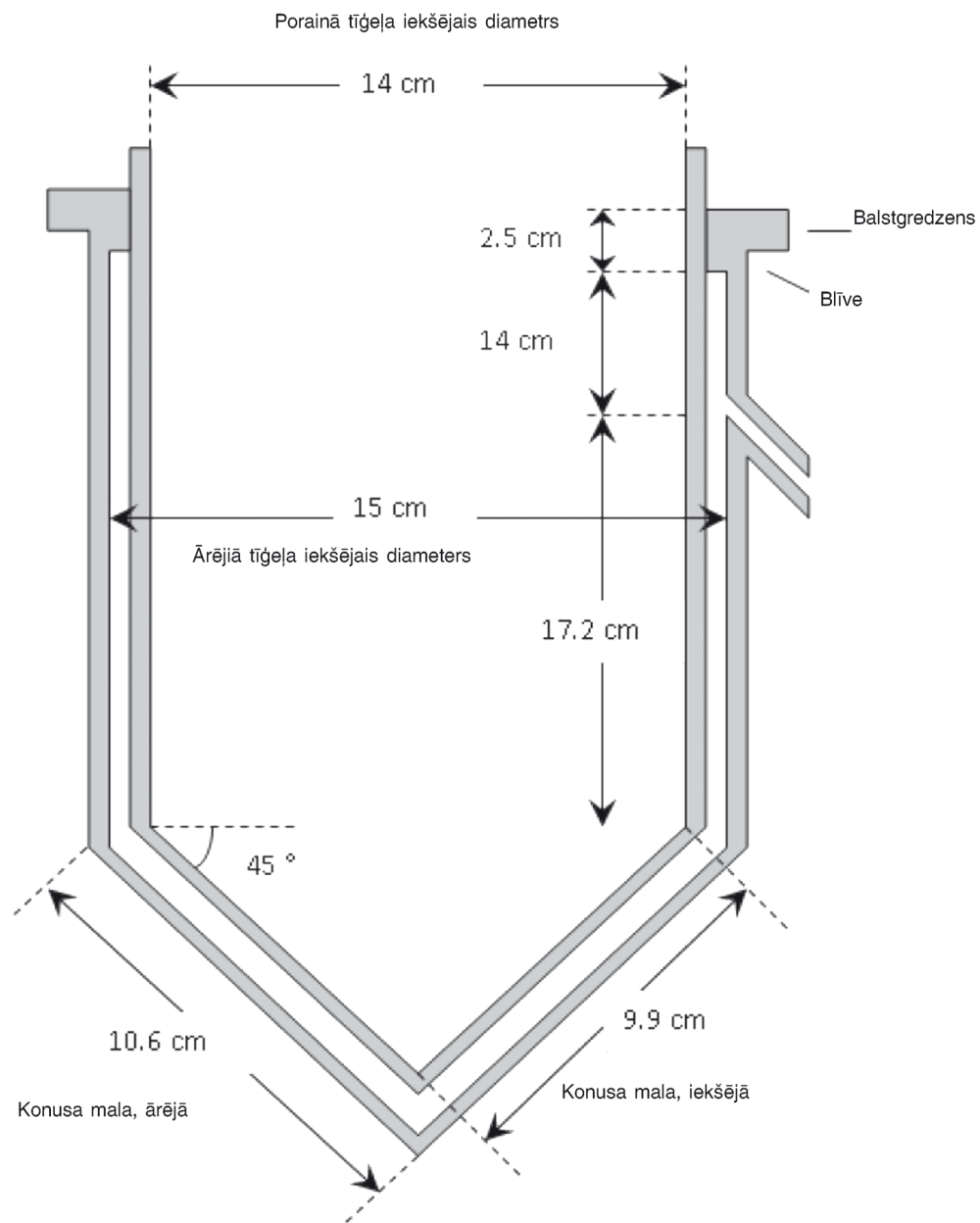
Porainais tīģelis



- | | |
|-----------------------------------|---------------------------|
| A. Glabāšanas trauks | E. Savākšanas trauks |
| B. Dozētājsūknis | F. Difuzors |
| C. Porainais aerācijas trauks | G. Gaisa plūsmas mēritājs |
| D. Ārējais necaurlaidīgais trauks | |

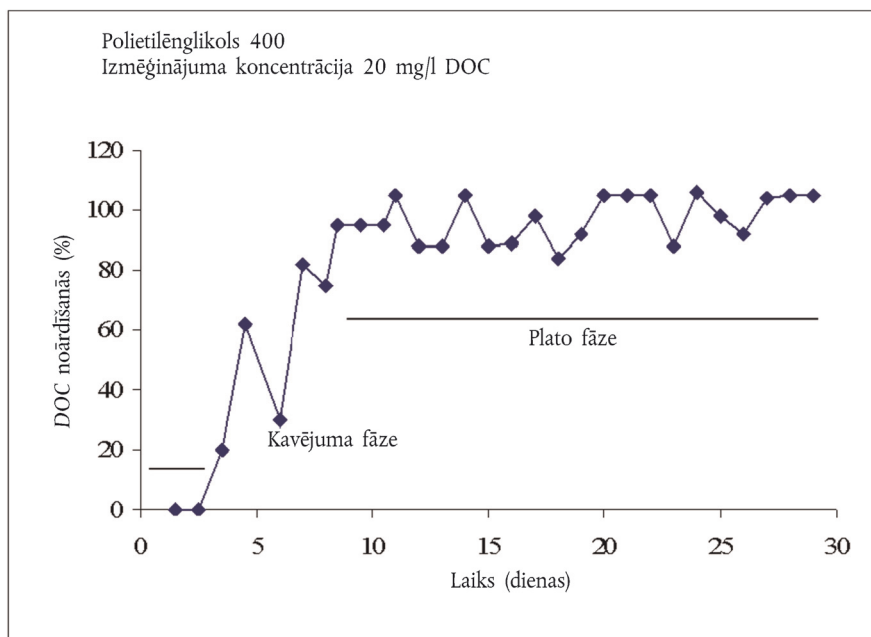
3. attēls

Trīslitru porainā tīģeļa aerācijas trauka daļas



2. papildinājums

Noārdīšanās līknes piemērs



3. papildinājums

[INFORMATĪVS]

TESTĒŠANAS BLOKU SAVIENOŠANA

Nolūkā izlīdzināt mikrobu populācijas dūņās testēšanas blokā, kas saņem notekūdeni kopā ar testējamo ķīmisko vielu, un kontroles blokā, kurš saņem tikai notekūdeni, tika ieviesta dūņu ikdienas apmaiņa (1). Šo procedūru sauc par savienošanu, un tā ir savienoto bloku metode. Savienošanu sākotnēji veica, izmantojot *Husmann* aktīvo dūņu blokus, bet tā ir īstenota arī ar porainā tīģeļa blokiem (2) (3). Netika atklātas nekādas būtiskas atšķirības rezultātos starp nesavienotiem un savienotiem blokiem neatkarīgi no tā, vai izmantoja *Husmann* vai poraina tīģeļa bloku, tāpēc nav nekādu priekšrocību, kas kompensētu iztērēto laiku un enerģiju, kura vajadzīga savienotajiem blokiem.

Dūņu apmaiņas var radīt iespaidu, ka notiek ievērojama noārdīšanās, jo daļa testējamās ķīmiskās vielas tiek pārvietota un testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas testēšanas un kontroles bloku attīrītajos notekūdeņos kļūst gandrīz vienādas. Tādējādi ir jāizmanto korekcijas koeficienti, kas ir atkarīgi no apmainītās daļas un vidējā hidrauliskās aiztures laika. Ir publicēti arī papildu dati par šo aprēķinu (1).

Ir jāaprēķina korigētā DOC vai COD noārdīšanās pakāpe, izmantojot vispārīgu formulu:

$$D_{tc} = (D_t - 100 \cdot a \cdot r/12) / (1 - a \cdot r/12) \%$$

kur:

D_{tc} = korigētais DOC vai COD noārdīšanās %;

D_t = noteiktais DOC vai COD noārdīšanās %;

a = apmaiņas daļa no aktīvo dūņu bloku daudzuma;

r = vidējais hidrauliskās aiztures laiks (h).

Ja, piemēram, tiek apmainīta puse aerācijas tvertnes daudzuma ($a = 0,5$) un ja vidējais hidrauliskās aiztures laiks ir 6 h, korekcijas formula ir:

$$D_{tc} = \frac{4D_t - 100}{3}$$

LITERATŪRA

- (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. 113. – 138. lpp. 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.

4. papildinājums

AKTĪVO DŪŅU INHIBĒŠANAS NOVĒRTĒJUMS

Testējamo ķīmisko vielu process

1. Pastāv iespēja, ka ķīmisko vielu (vai notekūdeni) nevar noārdīt imitācijas testā un ka tai ir inhibējoša ietekme uz dūņu mikroorganismiem. Citas ķīmiskās vielas bionoārdās zemās koncentrācijās, bet ir inhibējošas augstākā koncentrācijā (hormēze). Inhibējoša ietekme var parādīties agrīnā posmā vai var tikt noteikta, piemērojot, toksicitātes testu ar sējmateriālu, kas ir līdzīgs vai identisks imitācijas testā izmantotajam (1). Šādas metodes ietver skābekļa uzņemšanas inhibēšanu (šā pielikuma C.11. nodaļa (2) un ISO 8192 (3)) vai dūņu organismu vairošanās inhibēšanu (ISO 15522 (4)).
2. Imitācijas testā inhibēšanu uzrādīs izšķīdušā organiskā oglekļa (turpmāk – DOC) vai ķīmiskā skābekļa patēriņa (turpmāk – COD) atšķirība starp attīrīto notekūdeni no testēšanas bloka un no kontroles bloka, proti, šīs vērtības ir augstākas nekā DOC, ko pievienoja kā testējamo ķīmisko vielu. Izteikts citādi, organiskās barotnes DOC (un biokīmiskā skābekļa patēriņa (turpmāk – BOD), COD un/vai NH_4^+) noārdīšanās īpatsvars attīrīšanas laikā samazināsies testējamās ķīmiskās vielas klātbūtnes dēļ. Ja tas tā notiek, tests ir jāatkārto, samazinot testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju, līdz ir sasniegts līmenis, pie kura nenotiek inhibēšana, un, iespējams, turpinot samazināt šo koncentrāciju, līdz testējamā ķīmiskā viela bionoārdās. Tomēr, ja testējamā ķīmiskā viela (vai notekūdens) negatīvi ietekmē procesu visos koncentrācijas līmeņos, tas liecina, ka šo ķīmisko vielu ir grūti, varbūt pat neiespējami apstrādāt bioloģiski, bet var būt lietderīgi atkārtot testēšanu ar aktīvajām dūņām no cita avota un/vai ar dūņu pakāpeniskāku aklimatizāciju.
3. Savukārt, ja testējamā ķīmiskā viela imitācijas testā tiek bionoārdīta pirmajā mēģinājumā, tās koncentrācija ir jāpaliek, ja tas vajadzīgs, lai uzzinātu, vai šī ķīmiskā viela varētu būt inhibējoša.
4. Cenšoties noteikt inhibēšanas pakāpes, jāatceras, ka aktīvo dūņu populācija var mainīties, tādēļ laika gaitā mikroorganismi var izveidot toleranci pret inhibējošu ķīmisko vielu.
5. Inhibēšanas pakāpes aprēķins:

Testēšanas un kontroles bloka BOD, DOC, COD utt. kopējo noārdīšanās īpatsvaru (R_o) var aprēķināt pēc vienādojuma:

$$R_o = 100 (I - E)/I \%$$

kur:

I = BOD, DOC, COD utt. koncentrācija ielādē testēšanas vai kontroles traukos (mg/l);

E = attiecīgās koncentrācijas attīrītajos notekūdeņos (mg/l).

I un E ir jākoriģē DOC vajadzībām testējamās ķīmiskās vielas testēšanas blokos dēļ, jo pretējā gadījumā inhibēšanas īpatsvara aprēķins nebūs pareizs.

Testējamās ķīmiskās vielas klātbūtnes izraisīto inhibēšanas pakāpi var aprēķināt pēc vienādojuma:

$$\% \text{ inhibēšanas} = 100 (R_c - R_t)/R_c$$

kur:

R_c = noārdīšanās īpatsvars kontroles traukos;

R_t = noārdīšanās īpatsvars testēšanas traukos.

LITERATŪRA

- (1) Reynolds L *et al.* (1987). Evaluation of the toxicity of substances to be assessed for biodegradability. Chemosphere 16: 2259.
- (2) Šā pielikuma C.11. nodaļa "Biodegradācija – aktīvo dūņu respirācijas inhibīcijas tests".
- (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.

5. papildinājums

Ūdenī mazšķīstošas un gaistošas testējamās ķīmiskās vielas

Ūdenī mazšķīstošas ķīmiskās vielas

Par ūdenī mazšķīstošu un nešķīstošu ķīmisko vielu testēšanu testos, kas imitē notekūdeņu attīrīšanu, ir publicēts maz pārskatu (1) (2) (3).

Nav vienas testējamās ķīmiskās vielas dispersijas metodes, kas būtu piemērojama visām nešķīstošajām ķīmiskajām vielām. Divi no četriem metodes veidiem, kas aprakstīti ISO 10634 (4), varētu būt piemēroti mēģinājumiem disperģēt testējamās ķīmiskās vielas imitācijas testēšanā, proti, emulgatoru izmantošana un/vai ultraskaņas enerģija. Ir jānosaka stabilitāte vismaz izrietošās dispersijas 24 h periodos. Pēc tam atbilstīgi stabilizētas dispersijas, kas atrodas nepārtraukti maisītā rezervuārā (38. punkts), devās pievieno aerācijas tvertnei atsevišķi no sadzīves (vai sintētiskā) notekūdens.

Ja dispersijas ir stabilas, ir jāizpēta, kā testējamo ķīmisko vielu var noteikt disperģētā veidā. Visticamāk, DOC nebūs piemērots, tāpēc testējamai ķīmiskajai vielai būs jānosaka īpaša analītiskā metode, ko varētu piemērot attīrītajiem notekūdeņiem, notekūdeņu cietajām daļiņām un aktīvajām dūņām. Pēc tam testējamās ķīmiskās vielas sadalīšanos aktīvo dūņu procesa imitācijā noteiktu šķidrā un cietajā fāzē. Tādējādi tiktu noteikta "masas bilance", lai pieņemtu lēmumu, vai testējamā ķīmiskā viela ir bionoārdījusies. Tomēr tas norādītu vienīgi uz primāro bionoārdīšanos. Galīgo bionoārdīšanos jācenšas parādīt, veicot respirometrisko testēšanu attiecībā uz vieglu bionoārdīšanos (šā pielikuma C.4.-C, C.4.-F vai C.4.-D nodaļa (5)), kā sējmateriālu izmantojot dūņas, kas pakļautas testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai imitācijas testā.

Gaistošas ķīmiskās vielas

Notekūdeņu attīrīšanas imitāciju piemērošana gaistošām ķīmiskajām vielām ir gan apstrīdama, gan problemātiska. Tāpat kā par ūdenī mazšķīstošām testējamām ķīmiskajām vielām ir publicēts ļoti maz pārskatu, kuros būtu aprakstīti imitācijas testi ar gaistošām ķīmiskajām vielām. Pilnīgas maisīšanas iekārtas tradicionāls veids tiek pielāgots, noblīvējot aerācijas tvertni un nosēdētvertni, mērot un kontrolējot gaisa plūsmu ar plūsmas mērītājiem un izejas gāzi laižot cauri uztvērējiem, lai savāktu gaistošo organisko vielu. Dažos gadījumos izmanto vakuumsūkni, lai izejas gāzi ievilkto "aukstā" uztvērējā vai caurpūtes uztvērējā, kas satur Tenax un silikagēlu gāzes hromatogrāfiskajai analīzei. Uztvērējā esošo testējamo ķīmisko vielu var noteikt analītiski.

Testēšanu veic divās daļās. Blokus vispirms darbina bez dūņām, bet ar sintētisko notekūdeni kopā ar testējamo ķīmisko vielu, ko iesūknē aerācijas tvertnē. Dažas dienas vāc un analizē ieplūdes, attīrītā notekūdens un izejas gāzes paraugus, lai konstatētu testējamo ķīmisko vielu. No apkopotajiem datiem var aprēķināt tās testējamās ķīmiskās vielas īpatsvaru (R_V), kas atdalīta no sistēmas.

Pēc tam veic parasto bioloģisko testu (ar dūņām) darbības apstākļos, kas ir identiski atdalīšanas pētījumam. Veic arī DOC vai COD mērījumus, lai pārliecinātos, ka bloki strādā efektīvi. Testa pirmajā daļā veic periodiskas analīzes, lai noteiktu testējamo ķīmisko vielu ieplūdē, attīrītajā notekūdenī un izejas gāzē. Pēc aklimatizācijas analīzes veic biežāk. Arī šajā gadījumā no datiem stabilā stāvoklī var aprēķināt testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās īpatsvaru šķidrā fāzē, kuru izraisījuši visi procesi (R_T) (fiziskie un bioloģiskie), kā arī daļu (R_V), kas atdalīta no sistēmas.

Aprēķins

a) Nebioloģiski testējamā materiāla, kas atdalīts no sistēmas, īpatsvaru (R_{VP}) var aprēķināt pēc vienādojuma:

$$R_{VP} = \frac{S_{VP}}{S_{IP}} \cdot 100$$

kur:

R_{VP} = testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās izgaistot (%);

S_{VP} = testējamā ķīmiskā viela, kas savākta uztvērējā un izteikta kā koncentrācijas ekvivalents šķidrā fāzē (mg/l);

S_{IP} = testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija ieplūdē (mg/l).

b) Bioloģiski testējamā materiāla, kas atdalīts no sistēmas, īpatsvaru (R_V) var aprēķināt pēc vienādojuma:

$$R_V = \frac{S_V}{S_I} \cdot 100$$

kur:

R_V = testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās bioloģiskajā testēšanā izgaistot (%);

S_V = testējamā ķīmiskā viela, kas bioloģiskajā testēšanā savākta uztvērējā un izteikta kā koncentrācijas ekvivalents ieplūdē (mg/l);

S_I = testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija ieplūdē (mg/l).

- c) Bioloģiski testējamās ķīmiskās vielas īpatsvaru (R_T), kas noārdījies, pateicoties visiem procesiem, var noteikt pēc šāda vienādojuma:

$$R_T = 1 - \frac{S_E}{S_I} \cdot 100$$

kur:

S_E = testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija (šķidrā) attīrītajā notekūdenī (mg/l).

- d) Tādējādi ar bionoārdīšanos un adsorbciju noārdīto īpatsvaru (R_{BA}) var aprēķināt pēc vienādojuma:

$$R_{BA} = (R_T - R_V)$$

Jāveic atsevišķi testi, lai noteiktu, vai testējamā ķīmiskā viela ir tikusi adsorbēta. Ja ir, var veikt turpmāku korekciju.

- e) Salīdzinājums starp testējamās ķīmiskās vielas daļu, kas atdalīta no sistēmas bioloģiskajā (R_v) un nebioloģiskajā (R_{vp}) testēšanā, atspoguļo vispārējo ietekmi, kāda bioloģiskajai attīrīšanai ir bijusi uz testējamās ķīmiskās vielas emisiju gaisā.

Piemērs. Benzols

Dūņu aiztures laiks = 4 dienas

Sintētiskais notekūdens, aiztures laiks = 8 h

$$S_{IP} = S_I = 150 \text{ mg/l}$$

$$S_{VP} = 150 \text{ mg/l} \quad (S_{EP} = 0)$$

$$S_V = 22,5 \text{ mg/l}$$

$$S_E = 50 \text{ µg/l}$$

Tādējādi:

$$R_{VP} = 100 \%, R_V = 15 \%$$

$$R_T = 100 \% \text{ un } R_{BA} = 85 \%$$

Tika pieņemts, ka benzols netika adsorbēts uz dūņām.

LITERATŪRA

- (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) Šā pielikuma C.4. nodaļa "Vieglas bionoārdīšanās spējas noteikšana".

6. papildinājums

Dūņu aiztures laika ietekme uz ķīmisko vielu attīrāmību

IEVADS

1. Teksta pamatdaļā aprakstītā metode tika izstrādāta, lai noskaidrotu, vai testētās ķīmiskās vielas (parasti tās, par kurām ir zināms, ka tās būtībā, bet ne viegli, ir bionoārdāmas) var tikt bionoārdītas noteiktajās robežās notekūdeņu attīrīšanas iekārtās. Rezultāti ir izteikti noārdīšanas īpatsvarā un bionoārdīšanas īpatsvarā. Aktīvo dūņu bloku darbības apstākļi un ieplūdes izvēle paredz samērā plašas variācijas attiecībā uz testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju attīrītajā notekūdenī. Testēšanu veic tikai ar vienu dūņu cieto daļiņu nominālo koncentrāciju vai ar vienu nominālo dūņu aiztures laiku (turpmāk – SRT), un aprakstītie dūņu zuduma režīmi var nozīmēt, ka SRT var būtiski mainīties testēšanas laikā gan starp dienām, gan vienas dienas laikā.
2. Šeit aprakstītajā gadījumā (1) (2) SRT kontrolē daudz šaurākās robežās katrā 24 h periodā (tāpat kā notiek ar lieliem apjomiem), kā rezultātā attīrītajos notekūdeņos ir nemainīgāka koncentrācija. Ieteicams izmantot sadzīves notekūdeni, jo tas nodrošina nemainīgākus un augstākus noārdīšanas īpatsvarus. Tāpat tiek izpētīta vairāku SRT vērtību ietekme, savukārt detalizētākā pētījumā var noteikt temperatūras diapazona ietekmi uz koncentrāciju attīrītajos notekūdeņos.
3. Vēl nav vispārpieņemtas vienprātības attiecībā uz to, kuri kinētikas modeļi darbojas, kad ķīmiskās vielas bionoārdās notekūdeņu attīrīšanas apstākļos. Tika izraudzīts un apkopotajiem datiem piemērots *Monod* baktēriju vairošanās un substrātu izmantošanas modelis (1) (2), jo metodes mērķis bija piemērošana tikai tādām ķīmiskajām vielām, kas tiek izstrādātas daudzu tonnu apmērā, novedot pie koncentrācijām notekūdenī, kuras pārsniedz 1 mg/l. Vienkāršotā modeļa un veikto pieņēmumu derīgumu noteica, izmantojot spirtu etoksilātu rindas ar dažādām primārās bionoārdīšanas pakāpēm (2) (3).

Piezīme. Šīs metodes variants stingri pieturas pie šīs testēšanas metodes C.10.-A teksta, un ir uzskaitītas tikai tās daļas, kas atšķiras.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

4. Aktīvo dūņu porainā tīģeļa bloki, kas paredzēti (gandrīz) nepārtrauktu maisījuma zudumu nodrošināšanai, ļaujot ļoti precīzi kontrolēt dūņu aiztures laiku (SRT vai θ_d), tiek darbināti nesavienotā režīmā dažādos SRT un, ja vēlas, dažādās temperatūrās. Parasti aiztures laiks ir 2–10 dienas un temperatūra ir 5–20 °C. Notekūdeni, vēlams, sadzīves, un testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu atsevišķi devās pievieno blokiem ātrumā, kas nodrošina vajadzīgo dūņu aiztures laiku (3–6 stundas) un vajadzīgo testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju ieplūdē. Paralēli tiek darbināti kontroles bloki, kas nesāņem testējamo ķīmisko vielu, lai būtu iespējams salīdzinājums.
5. Var izmantot cita veida iekārtas, bet ir ļoti jāuzmanās, lai nodrošinātu, ka tiek panākta laba SRT kontrole. Piemēram, izmantojot iekārtas, kas ietver nosēdvertni, var būt vajadzīga iespēja nodrošināt cieto daļiņu zudumus ar iekārtas attīrīto notekūdeni. Jāveic arī īpaši drošības pasākumi, lai izvairītos no kļūdām dūņu daudzuma nosēdvertnē variāciju dēļ.
6. Blokus darbina katrā noteiktajā apstākļu kopumā un pēc tam, kad iestāties līdzsvars, apmēram triju nedēļu periodā nosaka vidējās stabila stāvokļa testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas attīrītajos notekūdeņos un, ja vēlas, DOC. Papildus testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās īpatsvara un, ja vēlas, DOC noteikšanai grafiskā veidā attēlo attiecības starp iekārtas darbības apstākļiem un koncentrāciju attīrītajā notekūdenī. No tā var aprēķināt nosacītas kinētikas konstantes un var prognozēt apstākļus, kādos testējamo ķīmisko vielu var apstrādāt.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

7. Piemēro C.10.-A nodaļas 12. un 13. punktu.

APSTIPRINĀŠANAI VAJADZĪGIE LĪMEŅI

8. Piemēro C.10.-A nodaļas 14. un 15. punktu.

ĶĪMISKĀ STANDARTVIELA

9. Piemēro C.10.-A nodaļas 16. punktu.

TESTĒŠANAS REZULTĀTU ATKĀRTOJAMĪBA

10. Piemēro C.10.-A nodaļas 17. un 18. punktu.

METODES APRAKSTS

Iekārta

11. Piemēroti ir izmantot pielāgotu porainā tīģeļa sistēmu (6.1. papildinājums). To veido iekšējais trauks (vai ieliktnis), kas izgatavots no 3,2 mm bieza poraina polipropilēna ar poru izmēru aptuveni 90 μm apmērā, un šuve ir pārlaidmētināta. (Tas nodrošina, ka bloks ir izturīgāks nekā C.10.-A nodaļas 21. punktā aprakstītais.) Ieliktni uzstāda necaur-laidīgā polietilēna ārējā traukā, kas sastāv no divām daļām: apaļas pamatnes, kurā ieburti caurumi, lai nodrošinātu divas gaisa līnijas un dūņu zuduma līniju, un augšējā cilindra, ko uzskrūvē uz pamatnes un kam ir atvere, kura izvietota tā, lai porainā tīģeļa traukā piegādātu zināmu tilpumu (3 l). Viena no gaisa līnijām ir aprīkota ar difuzoro akmeni, savukārt otra ir atvērta un izvietota taisnleņķos attiecībā pret akmeni tīģelī. Šī sistēma rada vajadzīgo turbulenci, lai nodrošinātu, ka tīģeļa saturs tiek pilnībā samaisīts, kā arī nodrošina izšķīdušā skābekļa koncentrācijas virs 2 mg/l.
12. Atbilstīgo skaitu bloku uztur kontrolētās temperatūrās 5–20 °C (± 1 °C) diapazonā vai nu ūdens vannās, vai nemai-nīgas temperatūras telpās. Ir vajadzīgi sūkņi, lai aerācijas traukos ievadītu testējamās ķīmiskās vielas šķīduma un nogulsņējušos dūņu devas vajadzīgajos ātrumos (attiecīgi 0–1 ml/min un 0–25 ml/min), kā arī trešais sūknis, lai no aerācijas traukiem izņemtu dūņu zudumus. Vajadzīgo dūņu zuduma plūsmas ļoti mazo ātrumu panāk, izmantojot sūkni, kas iestatīts ar lielāku ātrumu un ko, pateicoties taimerim, darbina periodiski, piemēram, darbinot to 10 sekundes minūtē, sūkņa padeves ātrums 3 ml/min apmērā nodrošina zuduma ātrumu 0,5 ml/min apmērā.

Filtrācijas iekārta vai centrifūga

13. Piemēro C.10.-A nodaļas 23. punktu.

Analītiskais aprīkojums

14. Piemēro C.10.-A nodaļas 24. punktu.

Ūdens

15. Piemēro C.10.-A nodaļas 25. un 26. punktu.

Organiskā barotne

16. Piemēro C.10.-A nodaļas 27. punktu.

Sintētiskais notekūdens

17. Piemēro C.10.-A nodaļas 28. punktu.

Sadzīves notekūdens

18. Piemēro C.10.-A nodaļas 29. punktu.

Aktīvās dūņas

19. Piemēro C.10.-A nodaļas 30. punktu.

Testējamo ķīmisko vielu rezerves šķīdumi

20. Piemēro C.10.-A nodaļas 31. un 32. punktu.

PROCEDŪRA

Sējmateriāla sagatavošana

21. Piemēro tikai C.10.-A nodaļas 34. punktu. Jāizmanto aktīvās dūņas (apm. 2,5 g/l).

Testēšanas bloku skaits

22. Vienkārša testa gadījumā, t. i., lai izmērītu noārdīšanās īpatnību, ir vajadzīgs tikai viens SRT, bet, lai iegūtu datus, kas vajadzīgi nosacīto kinētikas konstanšu aprēķināšanai, ir vajadzīgas 4 vai 5 SRT vērtības. Parasti izvēlas vērtības 2–10 dienu diapazonā. Praktiskā ziņā ir ērti veikt testēšanu ar 4 vai 5 SRT vienlaikus vienā temperatūrā. Plašākos pētījumos tās pašas SRT vērtības vai, iespējams, cita diapazona vērtības izmanto citās temperatūrās 5–20 °C diapazonā.

Primārajai bionoārdīšanai (galvenais lietojums) parasti vajadzīgs tikai viens bloks katram apstākļu kopumam. Taču galīgās bionoārdīšanās testēšanai katram apstākļu kopumam vajadzīgs kontroles bloks, kas saņem notekūdeni, bet nesaņem testējamo ķīmisko vielu. Ja uzskata, ka izmantotajā notekūdenī ir testējamā ķīmiskā viela, ir jāizmanto kontroles bloki, arī kad tiek novērtēta primāra bionoārdīšanās, un aprēķinos jāveic vajadzīgā korekcija.

Organiskās barotnes un testējamās ķīmiskās vielas dozēšana

23. Piemēro tikai C.10.-A nodaļas 36.–39. punktu, bet jāņem vērā, ka testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu dozē atsevišķi un ka izmanto dažādus dūņu zuduma ātrumus. Tāpat, ja vajadzīgs, ir jāuzrauga un jāpielāgo $\pm 10\%$ diapazonā ieplūdes un attīrīto notekūdeņu plūsmas ātrumi, kā arī dūņu zuduma regularitāte, piemēram, divreiz dienā. Ja, izmantojot sadzīves notekūdeni, analītiskajās metodēs rodas problēmas, testēšana jāveic ar sintētisko notekūdeni, bet ir jānodrošina, ka dažādās barotnes nodrošina salīdzināmus kinētikas datus.

Aktīvo dūņu bloku apstrāde

24. Piemēro C.10.-A nodaļas 40.–43. punktu, bet SRT ir jākontrolē tikai ar “nemainīgu” dūņu zudumu.

Paraugu ņemšana un analīze

25. Piemēro C.10.-A nodaļas 44.–50. punktu, izņemot to, ka testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija un DOC nav jānosaka obligāti. COD nevajadzētu izmantot.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

26. Piemēro C.10.-A nodaļas 52.–54. punktu.

Testa rezultātu izteikšana

27. Piemēro C.10.-A nodaļas 56.–62. punktu.

Kinētikas konstanšu aprēķināšana

28. Reālāk ir norādīt vidējo stabila stāvokļa testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju attīrītajā notekūdenī un aprakstīt, kā tā mainās atkarībā no iekārtas darbības apstākļiem, nekā norādīt primārās bionoārdīšanās īpatsvaru. To var izdarīt, apsverot 6.2. papildinājuma 6. vienādojumu, kas var nodrošināt K_S , μ_m un θ_{SC} (kritiskais dūņu aiztures laiks) vērtības.

(K_S un μ_m aptuvenās vērtības var arī noteikt, izmantojot vienkāršu datorprogrammu, lai no 2. vienādojuma (6.2. papildinājums) aprēķināto teorētisko līkni piemērotu iegūtajām testēšanas vērtībām. Lai gan nevienš šķīdums nebūs unikāls, var iegūt saprātīgu K_S un μ_m tuvinājumu.)

Rezultātu mainība

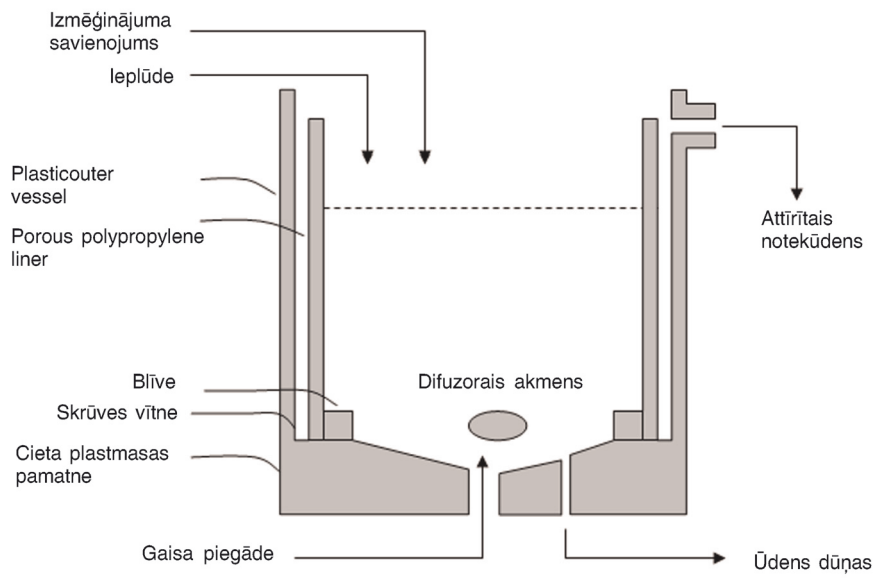
29. Parasti iegūst atsevišķu ķīmisko vielu kinētikas parametru mainīgās vērtības. Tiek uzskatīts, ka apstākļi, kādos dūņas ir augušas, kā arī testēšanas apstākļi (kā norādīts 5. punktā un citos testos) lielā mērā ietekmē rezultātu vērtības. Vienu no šīs mainības aspektiem ir aplūkojuši Grady *et al.* (4), kuri ir norādījuši, ka diviem galējiem apstākļiem jāizmanto termini “pastāvošs” un “raksturīgs”, kas apraksta fizioloģiskā stāvokļa robežas, kuras kultūra var sasniegt kinētiska testa laikā. Ja testēšanas laikā stāvoklim neļauj mainīties, kinētisko parametru vērtības atspoguļo apstākļus vidē, no kuras mikroorganismi tika paņemti. Šīs vērtības sauc par “pastāvošām” jeb pašreiz esošām. Otras galējības gadījumā, ja testēšanas apstākļi pieļauj olbaltumvielu sintezējošas sistēmas pilnīgu attīstību, atļaujot maksimālo vairošanās ātrumu, iegūtos kinētikas parametrus sauc par “raksturīgiem” un tie ir atkarīgi no substrāta veida un baktēriju veidiem kultūrā. Proti, pastāvošās vērtības iegūs, saglabājot zemu substrāta koncentrācijas koeficientu attiecībā pret atbilstīgajiem mikroorganismiem (S_0/X_0), piemēram, 0,025, savukārt raksturīgās vērtības rodas, ja šis koeficients ir augsts, piemēram, vismaz 20. Abos gadījumos S_0 jābūt vienādam ar attiecīgā puspiesātinājuma konstantes (K_S) vērtību vai jāpārsniedz tā.

30. Mainība un citi bionoārdīšanās kinētikas aspekti tika aplūkoti nesen notikušajā SETAC seminārā (5). Pateicoties šādiem pētījumiem, par kuriem ir sagatavoti pārskati, drīz vajadzētu iegūt skaidrāku priekšstatu par kinētiku saistībā ar notekūdeņu attīrīšanas iekārtām, lai būtu iespējams labāk interpretēt esošos datus, kā arī ierosināt atbilstīgākas turpmākas testēšanas metodes.

LITERATŪRA:

- (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.
 - (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.
-

6.1. papildinājums

Porainais tīģelis ar SRT kontroli

6.2. papildinājums

Kinētikas konstanšu aprēķināšana

1. Pieņemot, ka var piemērot *Monod* kinētiku, un ņemot vērā aktīvo cieto daļiņu un substrāta masas bilanci aktīvo dūņu sistēmā (1), var iegūt šādas stabila stāvokļa izteiksmes:

$$\text{vai} \quad \frac{1}{\vartheta_s} = \frac{\mu_m \cdot S_1}{K_s + S_1} - K_d \quad [1]$$

$$\text{kur:} \quad S_1 = \frac{K_s \cdot (1 + K_d \cdot \vartheta_s)}{\vartheta_s \cdot (\mu_m - K_d) - 1} \quad [2]$$

S_1 = substrāta koncentrācija attīrītajā notekūdenī (mg/l);

K_s = puspiesātinājuma konstante, pie kuras koncentrācija: $\mu = \mu_m/2$ (mg/l);

μ = īpatnējais vairošanās ātrums (d^{-1});

μ_m = μ_m maksimālā vērtība (d^{-1});

K_d = aktīvo cieto daļiņu īpatnējais samazināšanās ātrums (d^{-1});

ϑ_s = vidējais dūņu aiztures laiks (SRT) (d).

Šā vienādojuma izpētes rezultātā var izdarīt šādus secinājumus:

- i) koncentrācija attīrītajā notekūdenī ir atkarīga no koncentrācijas ieplūdē (S_0), tādējādi bionoārdīšanās īpatsvars mainās atkarībā no koncentrācijas ieplūdē (S_0);
- ii) vienīgais iekārtas kontroles parametrs, kas ietekmē S_1 , ir dūņu aiztures laiks (ϑ_s);
- iii) katrai koncentrācijai ieplūdē (S_0) būs kritiskais dūņu aiztures laiks, proti:

$$\text{kur:} \quad \frac{1}{\vartheta_{SC}} = \frac{\mu_s \cdot S_0}{K_s + S_0} - K_d \quad [3]$$

ϑ_{SC} = kritiskais dūņu aiztures laiks, kuru nesasniedzot atbilstīgie mikroorganismi tiks izskatoti ārā no iekārtas;

- iv) tā kā citi 2. vienādojuma parametri ir saistīti ar vairošanās kinētiku, temperatūra, visticamāk, ietekmēs substrāta līmeni attīrītajā notekūdenī un kritisko dūņu vecumu, t. i., dūņu aiztures laiks, kas vajadzīgs, lai iegūtu konkrētu attīrīšanas pakāpi, palielinātos, samazinoties temperatūrai.

2. No cieto daļiņu masas bilances porainā tīģeļa sistēmā un pieņemot, ka cieto daļiņu koncentrācija iekārtas attīrītajā notekūdenī (X_2) ir zema salīdzinājumā ar koncentrāciju aerācijas traukā (X_1), dūņu aiztures laiku var aprēķināt šādi:

$$\text{un} \quad \vartheta_s = \frac{V \cdot X_1}{(Q_0 - Q_1) \cdot X_2 + Q_1 \cdot X_1} \quad [4]$$

kur:

V = aerācijas trauka tilpums (l);

X_1 = cieto daļiņu koncentrācija aerācijas traukā (mg/l);

X_2 = cieto daļiņu koncentrācija attīrītajā notekūdenī (mg/l);

Q_0 = ieplūdes plūsmas ātrums (l/d);

Q_1 = dūņu zuduma plūsmas ātrums (l/d).

Tādējādi ir iespējams kontrolēt dūņu aiztures laiku jebkurā iepriekš noteiktā vērtībā, kontrolējot dūņu zuduma plūsmas ātrumu (Q_1).

Secinājumi:

3. Tādējādi testēšanas galvenais mērķis ir nodrošināt koncentrācijas attīrītajā notekūdenī prognozējamību un attiecīgi arī testējamās ķīmiskās vielas līmeņu saņemamošajos ūdeņos prognozējamību.

4. Grafiski attēlojot S_1 attiecībā pret ϑ_s , dažreiz var viegli novērtēt kritisko dūņu aiztures laiku (ϑ_{SC}), piemēram, 3. līkne 1. attēlā. Kad tas nav iespējams, ϑ_{SC} var aprēķināt kopā ar μ_m un K_s aptuvenām vērtībām, grafiski attēlojot S_1 , attiecībā pret $S_1 \cdot \vartheta_s$.

1. vienādojuma pārgrupēšana nodrošina šādu rezultātu:

$$\frac{S_1 \cdot \vartheta_s}{1 + \vartheta_s \cdot K_d} = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [5]$$

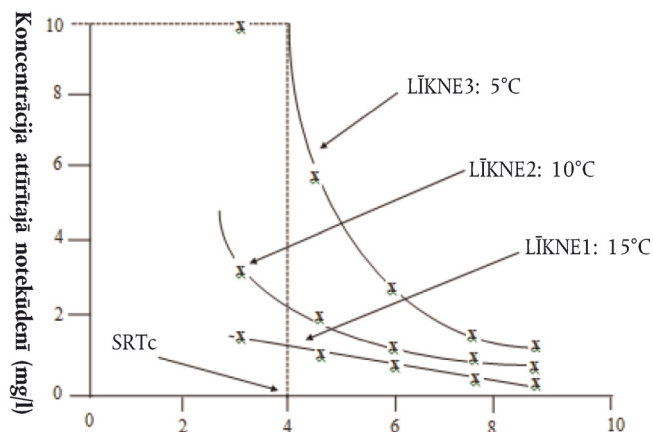
Ja K_d ir mazs, tad $1 + \vartheta_s \cdot K_d \sim 1$ un (5) kļūst:

$$S_1 \cdot \vartheta_s = \frac{K_s}{\mu_m} + \frac{S_1}{\mu_m} \quad [6]$$

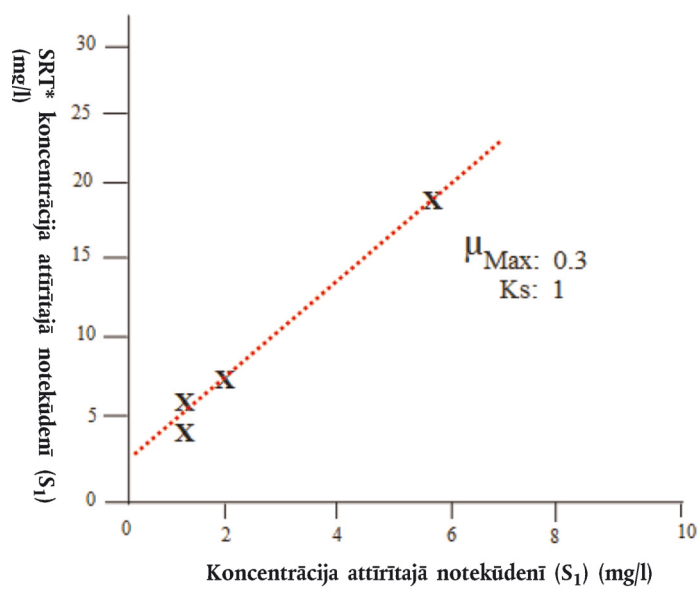
Tādējādi grafiskajam attēlojumam jābūt taisnei (sk. 2. attēlu) ar $1/\mu_m$ slīpumu un jāšķērso K_s/μ_m ; turklāt $\vartheta_s \sim 1/\mu_m$.

1. attēls

Trīs temperatūras, 5 SRT



2. attēls

Regresijas līnija $SRT \cdot S_1$ attiecībā pret S_1 pie $T = 5^\circ\text{C}$ 

Glosārijs

Koncentrācija attīrītajā notekūdenī:

Līkne:

7. papildinājums

TESTĒŠANA AR ZEMU ($\mu\text{g/l}$) KONCENTRĀCIJU DIAPAZONU

1. Ūdens vidē, pat notekūdeņos, parasti ir daudzas ķīmiskās vielas zemās koncentrācijās ($\mu\text{g/l}$). Šādās koncentrācijās tās, iespējams, nefunkcionē kā primāri substrāti, kas veicina vairošanos, bet, visticamāk, noārdās kā audzi neveidojoši, sekundāri substrāti kopā ar dažādām dabīgām oglekļa ķīmiskajām vielām. Tādēļ šādu ķīmisko vielu noārdīšanās nebūs piemērota 6. papildinājumā aprakstītajam modelim. Ir daudzi modeļi, ko varētu piemērot, un notekūdeņu attīrīšanas sistēmās pastāvošajos apstākļos vairāki no tiem varētu darboties vienlaikus. Ir vajadzīgs daudz vairāk pētījumu, lai izskaidrotu šo problēmu.
2. Teksta pamatdaļā (C.10.-A nodaļa) aprakstīto procedūru var izmantot tikai attiecībā uz primāro bionoārdīšanos, izmantojot zemas koncentrācijas ($< 100 \mu\text{g/l}$) un apstiprinātu analītisko procedūru. Bionoārdīšanās īpatnību var aprēķināt (sk. testēšanas metodes 54. punktu) ar nosacījumu, ka tiek ņemti vērā abiotiskie procesi (adsorbēcija, gais-tamība utt.). Kā piemēru var izmantot Nyholm un viņa kolēģu pētījumu (1) (2), kurā izmantoja 4 h ciklu uzpildīšanas un nolīšanas sistēmā. Šie pētījumi konstatēja pseido pirmās kārtas konstantes piecām ķīmiskajām vielām, ko pievienoja sintētiskajam notekūdenim $5\text{--}100 \mu\text{g/l}$ apmērā. Lai panāktu galīgu bionoārdīšanos, var izmantot ^{14}C -marķētas testējamās ķīmiskās vielas. Šādas pieejas apraksts neietilpst šīs testēšanas metodes darbības jomā, jo vēl nav panākta vienošanās par procedūru, lai gan ISO 14592 (3) vajadzībām ierosinātā metodē ir ietverti norādījumi par ^{14}C marķētu ķīmisko vielu izmantošanu.

SCAS testēšana

3. Vēlākā posmā tika ierosināts vienkāršāks divu posmu tests (4) (5) (6). Pēc daļēji nepārtrauktās aktīvo dūņu (turpmāk – SCAS) metodes veic īstermiņa kinētikas testēšanu ar paraugiem, kas ņemti no SCAS blokiem. SCAS sistēmu darbina ar zināmiem dūņu zuduma ātrumiem (pretēji sākotnējai testēšanas metodei C.12) un tajā iepilda modificētu ESAO sintētisko notekūdeni vai sadzīves notekūdeni. Sintētisko ūdeni modificēja (pH vērtības mainīšanās un vājas dūņu nogulsšanās spējas dēļ), pievienojot fosfātu kā buferšķīdumu, rauga ekstraktu, dzelzs (III) hlorīdu un mikroelementu sāļus, un tā COD paaugstināja aptuveni līdz 750 mg/l , palielinot peptona un gaļas ekstrakta koncentrāciju. Blokus darbināja 24 h ciklā: aerācija 23 h, dūņu zudums, nogulsšanās, dzidra šķīduma (attīrītā notekūdens) noņemšana, pēc kuras pievienot sintētisko notekūdeni kopā ar testējamo ķīmisko vielu līdz $100 \mu\text{g/l}$ (t. i., aptuveni tāda pati koncentrācija, kādu izmanto īstermiņa testēšanā). Reizi nedēļā 10 % no kopējā dūņu daudzuma aizvieto ar svaigām dūņām, lai saglabātu līdzsvarotu mikrobu populāciju.
4. Testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas izmēra sākumā un aerācijas beigās un testēšanu turpina, līdz sasniedz testējamās ķīmiskās vielas pastāvīgu noārdīšanos. Tas var aizņemt laiku no vienas nedēļas līdz vairākiem mēnešiem.

Īstermiņa testēšana

5. Īstermiņa testēšanu (piemēram, 8 h) veic, lai noteiktu (pseido) pirmās kārtas kinētiskā koeficienta konstanti testējamās ķīmiskās vielas samazinājumam aktīvajās dūņās, kas nāk no zināmiem, bet atšķirīgiem avotiem un lietojumiem. It sevišķi dūņu paraugus ņem no SCAS reaktoriem – aerācijas perioda beigās, kad organiskā substrāta koncentrācija ir zema, – aklimatizācijas testēšanas gaitā (3. un 4. punkts). Dūņas var ņemt arī no paralēla SCAS bloka, kam nepievieno testējamo ķīmisko vielu, lai veiktu salīdzinājumu. Dūņu un testējamās ķīmiskās vielas, ko pievieno divās vai vairākās koncentrācijās $1\text{--}50 \mu\text{g/l}$ diapazonā, maisījumiem veic aerāciju, nepievienojot sintētisko notekūdeni vai organisko substrātu. Šķīdumā saglabāto testējamo ķīmisko vielu nosaka regulāros intervālos, piemēram, reizi stundā, atkarībā no ķīmiskās vielas noārdīšanas spējas un ne ilgāk kā 24 stundu periodā. Pirms atbilstīgas analīzes veikšanas paraugus centrifugē.

Aprēķini

6. Datus no SCAS blokiem izmanto, lai aprēķinātu testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās īpatnību (54. punkts). Tāpat var aprēķināt vidējo koeficienta konstanti (K_1) (kas normalizēta suspendēto cieta daļiņu koncentrācijai) ar vienādojumu:

$$K_1 = 1/t \cdot \ln \frac{C_e}{C_i} \cdot 1/SS(1/\text{g h})$$

kur:

t = aerācijas laiks (23 h);

C_e = koncentrācija aerācijas perioda beigās ($\mu\text{g/l}$);

C_i = koncentrācija aerācijas sākumā ($\mu\text{g/l}$);

SS = aktīvo dūņu cieta daļiņu koncentrācija (g/l).

7. Īstermiņa testēšanā palikusi log % koncentrācija tiek grafiski attēlota attiecībā pret laiku, un grafiskā attēlojuma sākotnējās daļas slīpums (10–50 % noārdīšanās) atbilst K_1 (pseido) pirmās kārtas konstantei. Konstanti normalizē attiecībā uz dūņu cieta daļiņu koncentrāciju, dalot slīpumu ar dūņu cieta daļiņu koncentrāciju. Pārskatā norādītajam rezultātam ir jāietver arī dati par testējamās ķīmiskās vielas un suspendēto cieta daļiņu sākuma koncentrācijām, dūņu aiztures laiku, dūņu pievienošanu un avotu, kā arī par iepriekšēju pakļaušanu testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai (ja tāda bijusi).

Rezultātu mainība

8. Mainība un citi bionoārdīšanās kinētikas aspekti tika aplūkoti nesen notikušajā SETAC seminārā (7). Pateicoties šādiem pētījumiem, par kuriem ir sagatavoti pārskati, drīz vajadzētu iegūt skaidrāku priekšstatu par kinētiku saistībā ar notekūdeņu attīrīšanas iekārtām, lai būtu iespējams labāk interpretēt esošos datus, kā arī ierosināt atbilstīgākas turpmākas testēšanas metodes.

LITERATŪRA

- (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.
- (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 µg/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 (µg/l range) and standard (ppm range) chemical concentrations. *Chemosphere* 33 (4): 711-735.
- (6) Danish Environmental Protection Agency. (1996). Activated sludge biodegradability simulation test. Environmental Project, No. 337. Nyholm, N. Berg, UT. Ingerslev, F. 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.

C.10.-B. Bioplēves

IEVADS

1. Imitācijas testēšanu parasti veic ar ķīmiskajām vielām, kas nav sekmīgi noārdījušās vieglās bionoārdīšanās skrīninga testā (šā pielikuma C.4.-A–C.4.-F nodaļa (9)), bet ir noārdījušās potenciālās bionoārdīšanās testā. Izņēmuma kārtā imitācijas testēšanu veic arī ar ķīmiskajām vielām, par kurām vajadzīga papildu informācija, it sevišķi ar tādām, ko izstrādā daudzu tonnu apmērā, un parasti piemēro aktīvo dūņu testu (C.10.-A nodaļa). Tomēr dažās situācijās ir vajadzīga konkrēta informācija par ķīmiskās vielas reakciju uz notekūdeņu attīrīšanas metodēm, kuras ietver bioplēves, proti, perkolēšanas vai pilināšanas filtriem, rotējošajiem bioloģiskajiem kontaktoriem un virsotšajiem slāņiem. Lai nodrošinātu šo vajadzību, ir izstrādātas dažādas iekārtas.
2. *Gerike et al.* (1) izmantoja lielus pilināšanas pilotfiltrus, ko darbināja savienoto bloku režīmā. Šiem filtriem bija vajadzīga plaša telpa un samērā liels daudzums notekūdeņu vai sintētisko notekūdeņu. *Truesdale et al.* (2) aprakstīja mazākus filtriņus (diametrs 6 pēdas × 6 collas), kuros iepildīja dabīgu notekūdeni bez virsmaktīvajām vielām, bet tiem vienlaigā bija vajadzīgi lieli daudzumi. “Nobriedušās” bioplēves izveidei bija vajadzīgas 14 nedēļas, turklāt papildu 4–8 nedēļas bija vajadzīgas aklimatizācijai pēc testējamās virsmaktīvās vielas pirmās pievienošanas.
3. *Baumann et al.* (3) izstrādāja daudz mazāku filtru, kurā izmantoja poliestera “šķiedru”, kas iepriekš bija iemērkta aktivējās dūņās kā inertā barotnē, kura veicina bioplēves veidošanos. Testējamo ķīmisko vielu izmantoja kā vienīgo oglekļa avotu un bionoārdīšanos novērtēja no izšķīdušā organiskā oglekļa (turpmāk – DOC) mērījumiem ieplūdē un attīrītajā notekūdenī, kā arī no CO₂ daudzuma izejas gāzē.
4. *Gloyne et al.* (4) izvēlējās samērā atšķirīgu pieeju un izgudroja rotējošu cilindrisku reaktoru. Uz rotējošās caurules iekšējās virsmas izaudzēja bioplēvi uz zināmās virsmas platības, no caurules, kas izvietota slīpi nelielā leņķī attiecībā pret horizontāli, augšpusē ieplūdinot ieplūdes strūklu. Reaktoru izmanto, lai izpētītu virsmaktīvo vielu bionoārdīšanos (5), kā arī bioplēves optimālo biezumu un difūziju cauri plēvei (6). Šie pēdējie minētie autori izstrādāja reaktoru, kā arī pielāgoja to, lai būtu iespējams noteikt CO₂ izejas gāzē.

5. Analītiķu pastāvīgā komiteja (AK) šo rotējošo cilindrisko reaktoru ir pieņēmusi par standarta metodi, ar kuras palīdzību var novērtēt gan ķīmisko vielu bionoārdīšanos (7), gan notekūdeņu toksicitātes attīrāmību (8). Šeit aprakstītās metodes priekšrocības ir vienkāršība, kompakums, atkārtojamība un samērā mazie vajadzīgie organiskās barotnes daudzumi.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

6. Sintētisko vai sadzīves notekūdeni un testējamo ķīmisko vielu – maisījumā vai vienu pašu – ieplūdina uz lēni rotējošas, slīpi izvietotas caurules iekšējās virsmas. Uz iekšējās virsmas veidojas mikroorganismu slānis, kas līdzīgs biofiltra barotnē esošajam. Reaktora darbības apstākļus izvēlas tā, lai nodrošinātu pietiekamu organiskās vielas noārdīšanos un, ja vajadzīgs, amonija oksidāciju.
7. Attīrīto notekūdeni no caurules savāc un tam vai nu ļauj nogulsnēties, un/vai to filtrē pirms DOC un/vai testējamās ķīmiskās vielas analizēšanas ar īpašu metodi. Paralēli tādos pašos apstākļos tiek darbināti kontroles bloki, lai būtu iespējams salīdzinājums. Pieņem, ka starpība starp DOC koncentrācijām attīrītajā notekūdenī testēšanas blokā un kontroles blokā ir attiecināma uz testējamo ķīmisko vielu un tās organiskajiem metabolītiem. Šo starpību salīdzina ar pievienotās testējamās ķīmiskās vielas (kā DOC) koncentrāciju, lai aprēķinātu testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanos.
8. Bionoārdīšanas parasti var nošķirt no bioadsorbcijas, rūpīgi izpētot noārdīšanās un laika līkni. Apstiprinājumu parasti var iegūt, veicot vieglas bionoārdīšanās testu (skābekļa uzņemšana vai oglekļa dioksīda veidošanās), izmantojot aklimatizētu sējmateriālu, kas testa beigās paņemts no reaktoriem, kuri saņem testējamo ķīmisko vielu.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

9. Ir jābūt zināmai testējamās ķīmiskās vielas tīrībai, šķīdībai ūdenī, gaistamībai un adsorbcijas īpašībām, lai būtu iespējams pareizi interpretēt iegūstamos rezultātus.
10. Parasti gaistošas un mazšķīstošas ķīmiskās vielas nevar testēt, ja vien netiek īstenoti īpaši piesardzības pasākumi (sk. C.10.-A nodaļas 5. papildinājumu). Jābūt zināmai arī ķīmiskajai struktūrai vai vismaz empīriskajai formulai, lai būtu iespējams aprēķināt teorētiskās vērtības un/vai pārbaudīt parametru noteiktās vērtības, piemēram, teorētisko skābekļa patēriņu (turpmāk – *ThOD*) un *DOC*.
11. Piemērotāko testēšanas koncentrāciju izvēlei var būt noderīga informācija par testējamās ķīmiskās vielas toksisko iedarbību uz mikroorganismiem (sk. C.10.-A nodaļas 4. papildinājumu), kas var būt svarīga bionoārdīšanās spējas zemu vērtību pareizai interpretēšanai.

APSTIPRINĀŠANAI VAJADZĪGIE LĪMEŅI

12. Sākotnēji virsmaktīvo vielu primārās bionoārdīšanās līmenim bija jābūt 80 % un augstākam, pirms ķīmisko vielu varēja laist tirgū. Ja netiek sasniegts 80 % līmenis, var veikt šo imitācijas (apstiprināšanas) testu un virsmaktīvo vielu var laist tirgū tikai tad, ja vairāk nekā 90 % no konkrētās ķīmiskās vielas ir noārdīti. Attiecībā uz ķīmiskajām vielām parasti nav šaubu par sekmīgu vai nesekmīgu testēšanas rezultātu, un iegūto noārdīšanas īpatsvara vērtību var izmantot, lai aptuveni aprēķinātu iespējamo koncentrāciju vidē, ko var izmantot ķīmisko vielu radītā apdraudējuma novērtēšanā. Vairākos pētījumos ar tīrām ķīmiskām vielām atklātais *DOC* noārdīšanās īpatsvars bija > 90 % vairāk nekā trīs ceturtdaļās gadījumu un > 80 % no vairāk nekā 90 % ķīmisko vielu, kas uzrādīja jebkādu būtisku bionoārdīšanās pakāpi.

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

13. Lai nodrošinātu testa procedūras pareizu īstenošanu, dažreiz ir lietderīgi testēt ķīmiskās standartvielas, kuru reakcija ir zināma. Šādas ķīmiskās vielas ietver adipīnskābi, 2-fenilfenolu, 1-naftolu, difēnskābi un 1-naftālskābi.

TESTĒŠANAS REZULTĀTU ATKĀRTOJAMĪBA

14. Kādā AK laboratorijā konstatēja, ka relatīvā standartnovirze testa ietvaros ir 3,5 % un starp testiem – 5 % (7).

METODES APRAKSTS

Iekārta

Rotējošs cilindrisks reaktors

15. Iekārta (sk. 8. papildinājuma 1. un 2. attēlu) sastāv no vairākām akrila caurulēm, kas katra ir 30,5 cm gara ar 5 cm iekšējo diametru un balstās uz gumijas riteņiem, kuri ievietoti metāla balstrāmī. Katrai caurulei ir ārējā lūpa, aptuveni 0,5 cm dziļa, lai tā noturētos uz riteņiem. Iekšējā virsma ir padarīta nelīdzena ar rupjas struktūras

drāšu sūkli, un augšgalā (kur notiek ieplūde) atrodas 0,5 cm dziļa iekšējā lūpa, lai ierobežotu šķidrumu. Caurules ir novietotas slīpi, aptuveni 1 grāda leņķī attiecībā pret horizontāli, lai panāktu vajadzīgo saskarsmes laiku, kad testa barotni ieplūdina tīrā caurulē. Gumijas riteņus rotē, izmantojot lēnu, dažādu ātrumu motoru. Cauruļu temperatūru kontrolē, tās uzstādot nemainīgas temperatūras telpā.

16. Katru cauruļu reaktoru ievietojot nedaudz lielākā, slēgtā caurulē un nodrošinot, ka savienojumi ir gāzes necaurlaidīgi, ir iespējams savākt izejas CO_2 gāzi alkalīna šķīdumā, lai izdarītu turpmākus mērījumus (6).
17. Divdesmit litru glabāšanas traukā (A) (sk. 2. attēlu) glabā katras caurules organiskās barotnes 24 h vajadzīgo daudzumu, ja vajadzīgs, kopā ar pievienotu testējamo ķīmisko vielu. Ja vajadzīgs, testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu var dozēt atsevišķi. Netālu no katra glabāšanas trauka apakšas ir atvere, kas ar piemērotām caurulēm, piemēram, silikona gumijas caurulēm, un ar peristaltisko sūkni (B) ir savienota ar akrila piegādes cauruli, kura iestiepjas 2–4 cm slīpi izvietotās caurules (C) augšgalā (kur notiek ieplūde). Attīrītajam notekūdenim ļauj pilēt no slīpi izvietotās caurules apakšgala un to savāc citā glabāšanas traukā (D). Attīrītajam notekūdenim ļauj nogulsēties vai to filtrē pirms analīzes veikšanas.

Filtrācijas iekārta vai centrifūga

18. Iekārta paraugu filtrēšanai ar membrānas filtriem, kam ir pietiekama porainība (nominālais atvērums diametrs ir 0,45 μm) un kas adsorbē organiskās ķīmiskās vielas vai nelielā mērā laiž cauri organisko oglekli. Ja tiek izmantoti filtri, kas organisko oglekli neaiztur, tie ir rūpīgi jānomazgā ar karstu ūdeni, lai nomazgātu noskalojamo organisko oglekli. Var izmantot arī centrifūgu, kas spēj nodrošināt ātrumu 40 000 m/s^2 .
19. Analītiskais aprīkojums, lai noteiktu:

- DOC / kopējo organisko oglekli (turpmāk – TOC) vai ķīmisko skābekļa patēriņu (turpmāk – COD),
- konkrētu ķīmisko vielu (HPLC, GC utt.), ja vajadzīgs,
- pH, temperatūru, skābumu un sārmainību,
- amoniju, nitrītu un nitrātu, ja testēšanu veic nitrificējošos apstākļos.

Ūdens

20. Krāna ūdens, kurā DOC nepārsniedz 3 mg/l .
21. Destilēts vai dejonizēts ūdens, kurā DOC nepārsniedz 2 mg/l .

Organiskā barotne

22. Par organisko barotni var izmantot sintētisko notekūdeni, sadzīves notekūdeni vai abu maisījumu. Ir pierādīts, ka, ja tiek izmantots tikai sadzīves notekūdens, nereti var tikt uzrādīts lielāks DOC noārdīšanās īpatsvars (aktīvo dūņu blokos) un pat pieļauta dažu tādu ķīmisko vielu bionoārdīšanās, kuras bioloģiski nenoārdās, izmantojot ESAO sintētisko notekūdeni. Tādējādi ir ieteicams izmantot sadzīves notekūdeni. DOC (vai COD) koncentrācija ir jānosaka katrā jaunā organiskās barotnes partijā. Organiskās barotnes skābumam un sārmainībai ir jābūt zināmai. Barotnei var būt nepieciešams pievienot piemērotu buferšķīdumu (nātrija hidroģenkarbonātu vai kālija hidroģenfosfātu), ja tai ir zems skābums vai sārmainība, lai testēšanas laikā reaktorā pH uzturētu aptuveni $7,5 \pm 0,5$ robežās. Lēmums par buferšķīduma tilpumu un pievienošanas laiku jāpieņem katrā gadījumā atsevišķi.

Sintētiskais notekūdens

23. Jāšķīdina katrā litrā krāna ūdens: 160 mg peptona, 110 mg gaļas ekstrakta, 30 mg urīnvielas, 28 mg bezūdens dikālija hidroģenfosfāta (K_2HPO_4), 7 mg nātrija hlorīda (NaCl), 4 mg kalcija hlorīda dihidrāta ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) un 2 mg magnija sulfāta heptahidrāta ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Šis ESAO sintētiskais notekūdens ir piemērs un paredz vidējo DOC koncentrāciju ieplūdē aptuveni 100 mg/l apmērā. Var izmantot arī citus savienojumus ar apmēram tādām pašām DOC koncentrācijām, kas tuvāk atspoguļo faktisko notekūdeni. Šo sintētisko notekūdeni var izstrādāt destilētā ūdenī koncentrētā veidā un glabāt aptuveni 1 °C temperatūrā līdz pat vienai nedēļai. Kad vajadzīgs, jāatšķaida ar krāna ūdeni. (Šī barotne ir neapmierinoša, jo to raksturo, piemēram, ļoti augsta slāpekļa koncentrācija, samērā zems oglekļa saturs, bet nekas labāks nav atklāts, izņemot ieteikumu pievienot vairāk fosfātu kā buferšķīdumu un papildu peptonu).

Sadzīves notekūdens

24. Jāizmanto skaids, nogulsnesīgs notekūdens, kas iegūts ikdienas attīrīšanas darbos, kuros galvenokārt saņem sadzīves notekūdeni. Tas jāsavāc no primārās nosēdvertnes pārplūdes kanāla vai no barotnes aktīvo dūņu iekārtai, un tam lielākoties jābūt bez rupjām daļiņām. Notekūdeni var izmantot pēc vairāku dienu glabāšanas aptuveni 4 °C, ja tiek nodrošināts, ka glabāšanas laikā būtiski nesamazinās DOC (vai COD) (t. i., mazāk kā par 20 %). Lai ierobežotu sistēmas traucējumus, pirms izmantošanas katras jaunas partijas DOC (vai COD) ir jāpielāgo atbilstīgai nemainīgai vērtībai, piemēram, atšķaidot ar krāna ūdeni.

Smērviela

25. Peristaltiskā sūkņa skrituļu eļļošanai var izmantot glicerīnu vai olīveļļu. Abi ir piemēroti izmantošanai uz silikona gumijas caurulēm.

Testējamās ķīmiskās vielas rezerves šķīdumi

26. Ķīmiskajām vielām ar pietiekamu šķīdību jāsaņem rezerves šķīdumi dejonizētā ūdenī vai sintētiskā notekūdens minerālbarotnē, nodrošinot atbilstīgas koncentrācijas (piemēram, 1–5 g/l). Attiecībā uz nešķīstošām ķīmiskajām vielām sk. C.10.-A nodaļas 5. papildinājumu. Šī metode nav piemērojama gaistošām ķīmiskajām vielām, ja vien netiek pielāgoti cilindriskie reaktori (16. punkts). Jānosaka rezerves šķīduma DOC un TOC, un mērījumi jāatkārto katrai jaunai partijai. Ja atšķirība starp DOC un TOC pārsniedz 20 %, jāpārbauda testējamās ķīmiskās vielas šķīdība ūdenī. Jāsalīdzina DOC vai testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija, mērījumus izdarot ar rezerves šķīduma īpašu analīzi, ar nominālo vērtību, lai noskaidrotu, vai atgūšana ir pietiekami laba (parasti var paredzēt > 90 %). Jānoskaidro, it sevišķi attiecībā uz dispersijām, vai DOC var vai nevar izmantot kā analītisku parametru vai arī var izmantot vienīgi kā analītisku papēmienu, kas piemērots konkrētajai testējamajai ķīmiskajai vielai. Dispersijām ir vajadzīga paraugu centrifugēšana. Katrā jaunā partijā ir jānosaka DOC, COD vai testējamā ķīmiskā viela, veicot īpašu analīzi.
27. Jānosaka rezerves šķīduma pH. Galējās vērtības norāda, ka ķīmiskās vielas pievienošana, iespējams, ietekmē aktīvo dūņu pH testēšanas sistēmā. Tādā gadījumā rezerves šķīdums ir jāneitralizē, lai iegūtu pH 7 ± 0,5 apmērā, izmantojot nelielu neorganiskās skābes vai bāzes, bet izvairoties no testējamās ķīmiskās vielas nogulsnešanās.

*PROCEDŪRA**Organiskās barotnes sagatavošana dozēšanai*

28. Jānodrošina, ka gan testēšanas sākumā, gan tās laikā visas ieplūdes un attīrītā notekūdens tvertnes, kā arī caurules no ieplūdes tvertnēm un uz attīrītā notekūdens tvertnēm tiek rūpīgi iztīrītas, lai nomazgātu mikrobu kolonijas.
29. Katru dienu ir jāsaņem skaids sintētiskais notekūdens (23. punkts) vai nu no cietajām daļiņām, vai no koncentrētā rezerves šķīduma, to atbilstīgi atšķaidot ar krāna ūdeni. Vajadzīgais daudzums jānomēra mērcilindrā un jāiepilda tīrā ieplūdes traukā. Tāpat, ja vajadzīgs, sintētiskajam notekūdenim pirms atšķaidīšanas jāpievieno testējamās ķīmiskās vielas vai ķīmiskās standartvielas rezerves šķīduma vajadzīgais daudzums. Ja tā ir ērtāk vai ja tas vajadzīgs, lai izvairītos no testējamās ķīmiskās vielas zudumiem, jāsaņem atsevišķs testējamās ķīmiskās vielas atšķaidīts šķīdums atsevišķā rezervuārā un tas jāieplūšina slīpi izvietotajās caurulēs ar citu dozētājsūkni.
30. Var arī (un ir vēlams) izmantot nogulsnejušos sadzīves notekūdeni (24. punkts), ko katru dienu savāc skaigu, ja iespējams.

Rotējošo cilindrisko reaktoru darbināšana

31. Lai novērtētu vienu testējamo ķīmisko vielu, ir vajadzīgi divi identiski cilindriskie reaktori, ko montē nemainīgas temperatūras telpā, parasti 22 ± 2 °C.
32. Jāpielāgo peristaltiskie sūkņi, lai tie slīpi izvietotajās caurulēs, ko rotē ar ātrumu 18 ± 2 rpm, piegādātu organisko barotni (bez testējamās ķīmiskās vielas) 250 ± 25 ml/h apmērā. Sākumā un pēc tam periodiski testēšanas laikā uz sūkņa caurulēm aplīcē smērvielu (25. punkts), lai nodrošinātu atbilstīgu darbību un pagarinātu cauruļu darbību.
33. Jāpielāgo cauruļu slīpuma leņķis attiecībā pret horizontāli, lai nodrošinātu barotnes uzturēšanās laiku 125 ± 12,5 s apmērā tīrā caurulē. Ir jāaplēš aiztures laiks, barotnei pievienojot nebioloģisku marķieri (piemēram, NaCl, inerti krāsvielu): laiku, kas vajadzīgs, lai sasniegtu maksimālo koncentrāciju attīrītajā notekūdenī, uzskata par vidējo aiztures laiku (ja ir izveidojusies maksimālā plēve, aiztures laiks var palielināties līdz aptuveni 30 minūtēm).
34. Ir konstatēts, ka šie koeficienti, ātrumi un laiki nodrošina DOC (vai COD) atbilstīgu noārdīšanos (> 80 %) un nitrificētus attīrītus notekūdeņus. Ir jāizmaina plūsmas ātrums, ja noārdīšanās ir nepietiekama vai ja ir jāimitē konkrētas attīrīšanas iekārtas veiktspēja. Ja ir jāimitē konkrētas attīrīšanas iekārtas veiktspēja, ir jāpielāgo organiskās barotnes dozēšana, līdz reaktora veiktspēja atbilst attīrīšanas iekārtas veiktspējai.

Sējmateriāls

35. Gaisā pārnēsāts sējmateriāls var būt pietiekams, lai izraisītu mikroorganismu augšanu, ja izmanto sintētisko notekūdeni. Pretējā gadījumā barotnei trīs dienas jāpievieno 1 ml/l nogulsņējuša notekūdens.

Mērījumi

36. Regulāros intervālos ir jāpārlicinās, ka devas un rotēšanas ātrumi ir vajadzīgajās robežās. Tāpat jāizmēra attīrītā notekūdens pH, it sevišķi, ja paredzama nitrificēšanās.

Paraugu ņemšana un analīze

37. Paraugu ņemšanas metodi, pieeju un regularitāti izvēlas atbilstīgi testēšanas mērķim. Piemēram, var ņemt ieplūdes un attīrītā notekūdens ātros paraugus vai savākt paraugus ilgākā laikposmā, piemēram, 3–6 h. Sākumā, kad nav pievienota testējamā ķīmiskā viela, paraugi jāņem divreiz nedēļā. Paraugi jāfiltrē cauri membrānām vai jācentrifugē aptuveni 40 000 m/s² ātrumā apmēram 15 minūtes (18. punkts). Pirms filtrēšanas cauri membrānai var būt nepieciešams paraugiem ļaut nogulsnēties un/vai tos filtrēt cauri filtram ar rupjām porām. DOC (vai COD) ir jānosaka vismaz divreiz un, ja vajadzīgs, jānosaka arī BOD, amonijs un nitrīts/nitrāts.
38. Visas analīzes jāveic pēc iespējas ātrāk pēc paraugu savākšanas un sagatavošanas. Ja analīzes ir jāatliek, paraugi ir jāglabā pilnās, cieši aizvākotās pudelēs 4 °C un tumsā. Ja paraugi ir jāglabā ilgāk par 48 h, tie jāuzglabā saldēti, ar paskābināšanu vai pievienojot piemērotu toksisku vielu (piemēram, 20 ml/l no 10 g/l dzīvsudraba (II) hlorīda šķīduma). Ir jānodrošina, ka uzglabāšanas paņēmieni neietekmē analīzes rezultātus.

Piestrādes laiks

39. Šajā laikposmā virsmas bioplēve aug, lai sasniegtu optimālo biezumu, un parasti tas aizņem aptuveni divas nedēļas. Šim laikam nevajadzētu pārsniegt sešas nedēļas. DOC (vai COD) noārdīšanās (44. punkts) palielinās un sasniedz plato vērtību. Kad plato ir sasniegts līdzīgā vērtībā abās caurulēs, vienu izvēlas par kontroles cauruli testa atlikušajai daļai, kuras laikā šo cauruļu veikspējai jāsiglabājas konsekventai.

Testējamās ķīmiskās vielas pievienošana

40. Šajā posmā otrā reaktorā ir jāpievieno testējamā ķīmiskā viela vajadzīgajā koncentrācijā, parasti 10–20 mg C/l. Kontroles caurule turpina saņemt tikai organisko barotni.

Aklimatizācijas periods

41. Ir jāturpina DOC (vai COD) analīžu veikšana divreiz nedēļā, un, ja ir jānovērtē primārās bionoārdīšanās spēja, ar īpašu analīzi jānosaka arī testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija. Pēc testējamās ķīmiskās vielas pirmās pievienošanas jānogaida 1–6 nedēļas (vai ilgāk, ja pastāv īpaši apstākļi), lai sāktos aklimatizācija. Kad noārdīšanās īpatsvars (43.–45. punkts) sasniedz maksimālo vērtību, jāiegūst 12–15 derīgas vērtības plato fāzē aptuveni triju nedēļu laikā, lai novērtētu vidējo noārdīšanās īpatsvaru. Testu uzskata par pabeigtu, ja ir sasniegta pietiekami augsta noārdīšanās pakāpe. Parasti testēšanas ilgums nedrīkstētu pārsniegt 12 nedēļas pēc testējamās ķīmiskās vielas pirmās pievienošanas.

Plēves nomešana

42. Nevajadzīgās plēves pēkšņa noārdīšanās vai nomešana no caurulēm notiek samērā regulāros intervālos. Lai nodrošinātu, ka netiek skarta rezultātu salīdzināmība, testēšanā jāļauj ietvert vismaz divi pilni augšanas un nomešanas cikli.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

43. Jāaprēķina testējamās ķīmiskās vielas DOC vai COD noārdīšanās īpatsvars katrā plānotajā novērtējumā, izmantojot šādu vienādojumu:

$$D_t = 100 [C_s - (E - E_0)]/C_s \%$$

kur:

D_t = DOC (vai COD) noārdīšanās īpatsvars laikā t ;

C_s = DOC (vai COD) koncentrācija ieplūdē testējamās ķīmiskās vielas dēļ, ko ieteicams aplēst no koncentrācijas rezerves šķīdumā un no tā pievienotā daudzuma (mg/l);

E = izmērītā *DOC* (vai *COD*) vērtība testēšanas reaktora attīrītajā notekūdenī laikā t (mg/l);

E_o = izmērītā *DOC* (vai *COD*) vērtība kontroles reaktora attīrītajā notekūdenī laikā t (mg/l).

Ja tiek testēta ķīmiskā standartviela, aprēķins jāatkārto arī ar to.

Kontroles reaktora veikspēja

44. Organiskās barotnes *DOC* (vai *COD*) noārdīšanās (D_B) kontroles reaktoros ir lietderīga informācija, lai novērtētu bioplēves bionoārdīšanās aktivitāti testēšanas laikā. Noārdīšanās īpatsvars ir jāaprēķina pēc vienādojuma:

$$D_B = 100 (1 - E_o/C_m) \%$$

kur:

C_m = organiskās barotnes *DOC* (vai *COD*) kontroles ieplūdē (mg/l).

45. Jāaprēķina testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās (D_{ST}), ja tā ir izmērīta, ar konkrētu analītisko metodi katra plānotā novērtējuma laikā pēc vienādojuma:

$$DST = 100 (1 - S_e/S_i) \%$$

kur:

S_i = izmērītā vai, vēlams, aplēstā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas ieplūdē (mg/l);

S_e = izmērītā testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas attīrītajā notekūdenī (mg/l).

Ja analītiskā metode sniedz pozitīvu vērtību nemainītā notekūdens ekvivalentā S_c mg/l, noārdīšanās īpatsvars (D_{SC}) jāaprēķina pēc vienādojuma:

$$DSC = 100 (S_i - S_e + S_c)/(S_i + S_c) \%$$

Testēšanas rezultātu izteikšana

46. Ir grafiski jāattēlo noārdīšanās īpatsvars D_t un D_{ST} (vai D_{SC}), ja pieejams, attiecībā pret laiku (sk. C.10.-A nodaļas 2. papildinājumu). Par testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās īpatsvaru uzskata plato fāzē iegūto 12–15 D_T (un D_{ST} , ja pieejams) vērtību vidējo novirzi (kas izteikta tuvākajā veselajā skaitlī) un standartnovirzi. No noārdīšanās līknes formas var izdarīt dažus secinājumus par noārdīšanās procesiem.

Adsorbcija

47. Ja ir novērota testējamās ķīmiskās vielas *DOC* būtiska noārdīšanās testēšanas sākumā, testējamā ķīmiskā viela, iespējams, tiek noārdīta ar adsorbciju uz bioplēves. Var būt iespējams to pierādīt, nosakot adsorbēto testējamo ķīmisko vielu uz cietajām daļiņām, kas nomestas no plēves. Parasti adsorbējamu ķīmisko vielu *DOC* noārdīšanās pakāpe nesaglabājas augsta visā testēšanas laikā, proti, parasti noārdīšanās pakāpe ir augsta sākumā un pēc tam tā pakāpeniski samazinās līdz līdzsvara vērtībai. Ja tomēr adsorbētā testējamā ķīmiskā viela spēja izraisīt mikrobu populācijas aklimatizāciju, testējamās ķīmiskās vielas *DOC* noārdīšanās pēc tam pieaugtu un sasniegtu augstu plato līmeni.

Kavējuma fāze

48. Tāpat kā statistajos, arī skrīninga testos daudzām testējamām ķīmiskajām vielām ir vajadzīga kavējuma fāze, pirms notiek pilnīga bionoārdīšanās. Kavējuma fāzē atbilstīgo baktēriju aklimatizācija (vai pielāgošanās) notiek, testējamai ķīmiskajai vielai gandrīz nemaz nenoārdoties, savukārt tad sākas šo baktēriju vairošanās. Ir pieņemts, ka šī fāze beidzas un noārdīšanās fāze sākas brīdī, kad ir noārdījušies aptuveni 10 % no testējamās ķīmiskās vielas sākotnējā daudzuma (pēc adsorbcijas, ja tāda notiek). Kavējuma fāze nereti ir ļoti mainīgs rādītājs, kam ir sliktā atkārtotamība.

Plato fāze

49. Nepārtrauktā testēšanā noārdīšanās līknes plato fāzi definē kā fāzi, kurā notiek vislielākā noārdīšanās. Šai fāzei jāilgst vismaz trīs nedēļas un jābūt aptuveni 12–15 izmērītām derīgām vērtībām.

Testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās vidējā pakāpe

50. Jāaprēķina vidējā vērtība no testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās vērtībām D_t (un D_{st} , ja pieejams) plato fāzē. Noapaļojot to līdz tuvākajam veselajam skaitlim (1 %), iegūst testējamās ķīmiskās vielas noārdīšanās pakāpi. Ieteicams arī aprēķināt vidējās vērtības 95 % ticamības intervālu. Līdzīgi ir jāaprēķina organiskās barotnes noārdīšanās vidējā pakāpe (D_B) kontroles traukā.

Norādes par bionoārdīšanos

51. Ja testējamā ķīmiskā viela būtiski neadsorbējas uz bioplēves un ja noārdīšanās liknei ir tipiska bionoārdīšanās līknes forma ar kavējuma, noārdīšanās un plato fāzēm (48. un 49. punkts), izmērīto noārdīšanos var droši attiecināt uz bionoārdīšanos. Ja sākumā ir novērota augsta noārdīšanās pakāpe, imitācijas testēšanā nevar nošķirt bioloģiskos un abiotiskos noārdīšanās procesus. Šādos gadījumos un gadījumos, kad pastāv šaubas par bionoārdīšanos (piemēram, ja notiek atdalīšanās), ir jāanalizē adsorbētā testējamā ķīmiskā viela uz plēves paraugiem vai jāveic papildu statistiskie (skrīninga) bionoārdīšanās spējas testi, pamatojoties uz parametriem, kas skaidri uzrāda bioloģiskus procesus. Šādi testi ietver skābekļa uzņemšanas metodes (šā pielikuma C.4.-D, C.4.-E un C.4.-F nodaļa) (9) vai testu ar CO_2 veidošanās mērīšanu (šā pielikuma C.4.-C nodaļa vai brīvā tilpuma metode) (10). Kā sējmateriāls ir jāizmanto iepriekš eksponēta bioplēve no atbilstīga reaktora.

52. Ja ir izmērīta gan DOC, gan konkrētas ķīmiskās vielas noārdīšanās, būtiskas atšķirības (pirmā minētā ir zemāka par otro) starp noārdīšanās īpatsvaram norāda uz organisku starpproduktu klātbūtni attīrītajos notekūdeņos, kurus, iespējams, ir grūtāk noārdīt. Tie ir jāizpēta.

Testēšanas rezultātu derīgums

53. Testēšanu uzskata par derīgu, ja DOC (vai COD) noārdīšanās pakāpe (D_B) kontroles blokos ir > 80 % pēc divu nedēļu darbības un ja nav iegūti neparasti novērojumi.
54. Ja ir testēta viegli bionoārdāma ķīmiskā viela (ķīmiskā standartviela), bionoārdīšanās pakāpei jābūt > 90 % un atšķirībai starp divām vērtībām nevajadzētu pārsniegt 5 %. Ja nav atbilstības šiem kritērijiem, jāpārskata testēšanas procedūras un/vai jāiegūst sadzīves notekūdens no cita avota.
55. Tāpat arī atšķirībām starp bionoārdīšanās vērtībām no diviem blokiem (ja tos izmanto), kas attīra testējamo ķīmisko vielu, nevajadzētu pārsniegt 5 %. Ja nav atbilstības šim kritērijam, bet noārdīšanās pakāpe ir augsta, analīze ir jāturpina vēl trīs nedēļas. Ja noārdīšanās pakāpe ir zema, jāizpēta testējamās ķīmiskās vielas inhibējošā ietekme, ja tā nav zināma, un tests jāatkārto ar testējamās ķīmiskās vielas zemāku koncentrāciju, ja tas ir iespējams.

Testēšanas pārskats

56. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela:

- identifikācijas dati,
- fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikāli ķīmiskās īpašības.

Testēšanas apstākļi:

- jebkādas testēšanas sistēmas izmaiņas, it sevišķi, ja testē nešķīstošas un gaistošas vielas,
- organiskās barotnes veids,
- rūpniecisko notekūdeņu daļa un veids notekūdeņos, ja to izmanto un ja tas ir zināms,
- sējmateriāla pievienošanas metode,
- testējamās ķīmiskās vielas rezerves šķīdums – DOC un TOC saturs, kā sagatavots, ja tā ir suspensija, testēšanā izmantotās koncentrācijas, iemesli, ja DOC pārsniedz 10–20 mg/l diapazonu, pievienošanas metode, pirmās pievienošanas datums, jebkādas izmaiņas koncentrācijā,

- vidējais hidrauliskās aiztures laiks (bez vairošanās), caurules rotēšanas ātrums, aptuvenais slīpuma leņķis, ja iespējams,
- dati par nomešanu, laiku un intensitāti,
- testēšanas temperatūra un diapazons,
- izmantotie analītiskie paņēmieni.

Testēšanas rezultāti:

- visi izmēritie dati (DOC, COD, īpašās analīzes, pH, temperatūra, N ķīmiskās vielas, ja vajadzīgs),
- visi aprēķinātie D_t (vai D_{t0}), D_B un D_s dati tabulas formātā un noārdīšanās līknes,
- informācija par kavējuma un plato fāzēm, testēšanas ilgumu, testējamās ķīmiskās vielas, ķīmiskās standartvielas (ja to testē) un organiskās barotnes noārdīšanās pakāpi (kontroles blokā) kopā ar statistikas informāciju un paziņojumiem par bionoārdīšanos un testēšanas derīgumu,
- rezultātu apspriešana.

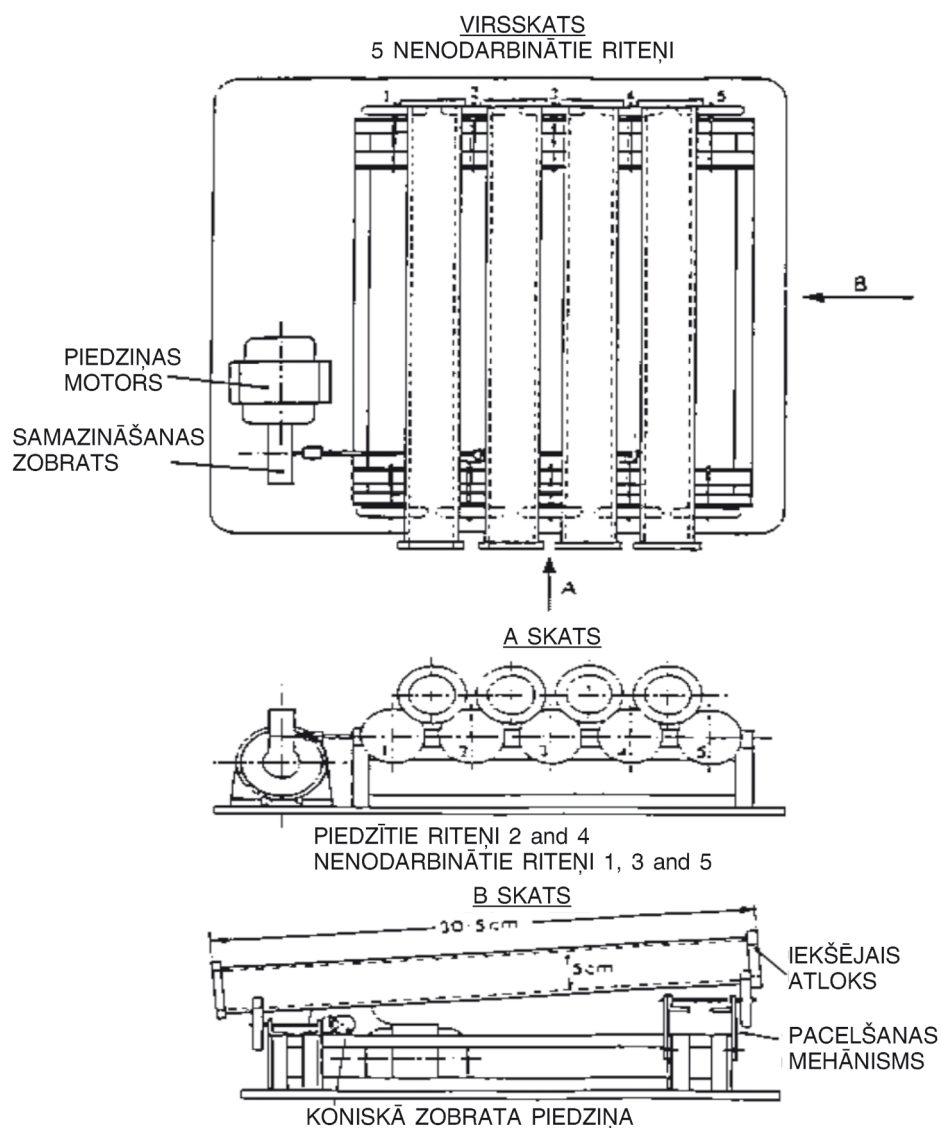
LITERATŪRA

- (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) Šā pielikuma C.4. nodaļa "Viegļas" bioloģiskās noārdīšanās spējas noteikšana", A-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.

8. papildinājums

1. attēls

Rotējošās caurules



Glosārijs

Virsskats:

A/B skats:

Piedzītie riteņi:

Nenodarbinātie riteņi:

Piedziņas motors:

Samazināšanas zobrats:

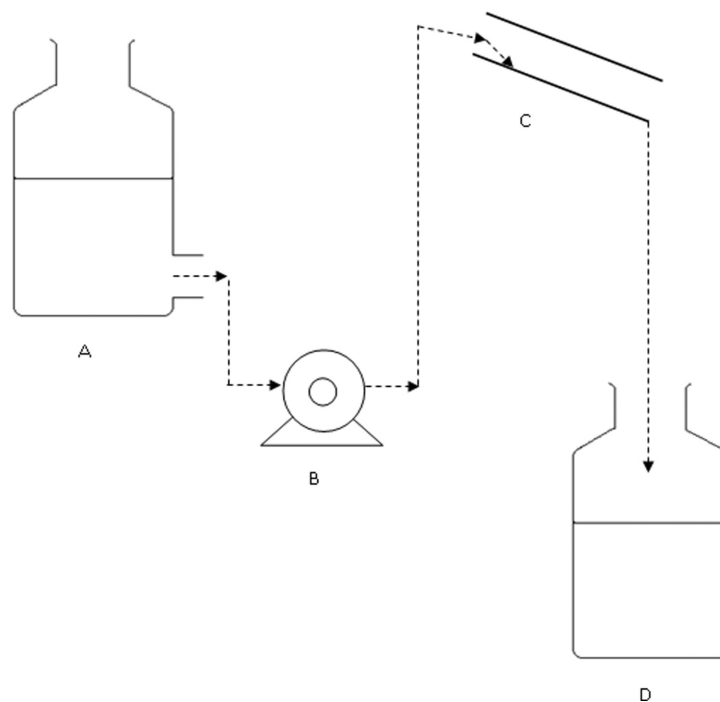
Iekšējais atloks:

Pacelšanas mehānisms:

Koniskā zobrata piedziņa:

2. attēls

Plūsmas diagramma



A: Barotnes tvertne

B: Peristaltiskais sūknis

C: Rotējošā caurule

D: Attīrītā notekūdens savākšanas trauks

DEFINĪCIJAS

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

Ķīmiskās vielas: jāņem vērā, ka terminu "ķīmiskā viela" plaši izmanto Apvienoto Nāciju Organizācijas Konferences par vidi un attīstību (turpmāk – UNCED) nolīgumos un turpmākos dokumentos, lai aprakstītu vielas, produktus, maisījumus, preparātus vai jebkādus citus terminus, ko var izmantot esošajās sistēmās, lai apzīmētu termina piemērošanas jomu.”;

10) pievieno šādu C.27., C.28., C.29. un C.30. nodaļu:

“C.27. TOKSICITĀTES TESTS AR NOSĒDUMU UN ŪDENS HIRONOMĪDIEM, IZMANTOJOT PIESĀTINĀTUS NOSĒDUMUS

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (turpmāk – TG) 218 (2004. gads). Šī testēšanas metode ir izstrādāta ietekmes novērtēšanai, kuru izraisa ķīmisko vielu ilgstoša iedarbība uz nosēdumos dzīvojošiem saldūdens divspārņu kārtas kāpuriem *Chironomus* sp. Tās pamatā ir esošie toksicitātes testēšanas protokoli attiecībā uz *Chironomus riparius* un *Chironomus tentans*, kas ir izstrādāti Eiropā (1) (2) (3) un Ziemeļamerikā (4) (5) (6) (7) (8) un kam veikta salīdzinošā izpēte (1) (6) (9). Var izmantot arī citas hironomīdu sugas, piemēram, *Chironomus yoshimatsui*, par ko pieejami detalizēti apraksti (10) (11).
2. Šajā testēšanas metodē izmantotais ekspozīcijas scenārijs paredz nosēdumu piesātināšanu ar testējamo ķīmisko vielu. Atbilstīgā ekspozīcijas scenārija izvēle ir atkarīga no paredzētā testēšanas pielietojuma. Nosēdumu piesātināšanas scenārija mērķis ir imitēt ķīmisko vielu akumulācijas līmeņus nosēdumos. Šī ekspozīcijas sistēma paredz nosēdumu un ūdens testēšanas sistēmas nosēdumu piesātināšanu.
3. Vielas, kas jātestē, lai noskaidrotu to iedarbību uz nosēdumos dzīvojošiem organismiem, parasti nosēdumos pastāv ilgstoši. Nosēdumos dzīvojošie organismi var tikt pakļauti iedarbībai dažādos veidos. Katra ekspozīcijas veida relatīvā nozīme un laiks, kas pāiet, lai rastos vispārēja toksiska iedarbība, ir atkarīgs no attiecīgās ķīmiskās

vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām. Tādu vielu gadījumā, kam ir spēcīga adsorbēšanās spēja (piemēram, ar $\log K_{ow} > 5$) vai kas izveido homopolāru saitī ar nosēdumiem, būtisks ekspozīcijas veids var būt piesārņotas barības uzņemšana. Lai nodrošinātu, ka izteikti lipofilu vielu toksicitāte tiek novērtēta pietiekami precīzi, var apsvērt nosēdumiem pievienotās barības izmantošanu pirms testējamās ķīmiskās vielas pievienošanas. Lai ņemtu vērā visus iespējamās ekspozīcijas veidus, šī testēšanas metode koncentrējas uz ilgtermiņa ekspozīciju. Testēšana ilgst 20–28 dienas *C. riparius* un *C. yoshimatsui* sugām un 28–65 dienas *C. tentans* sugai. Ja īpašiem nolūkiem ir vajadzīgi īstermiņa dati, piemēram, lai izpētītu nestabilas ķīmiskās vielas ietekmi, pēc 10 dienām var pārtraukt papildu atkārtojumus.

4. Mērītie mērķparametri ir izšķīlušos pieaugušo īpatņu kopējais skaits un izšķīšanās laiks. Ir ieteicams kāpuru izdzīvošanas un augšanas mērījumus veikt tikai pēc 10 dienām, ja ir vajadzīgi papildu īstermiņa dati, pēc vajadzības izmantojot papildu atkārtojumus.
5. Ieteicams izmantot izstrādātus nosēdumus. Izstrādātiem nosēdumiem ir vairākas priekšrocības salīdzinājumā ar dabīgiem nosēdumiem:
 - tiek samazināta eksperimentālā mainība, jo šādi nosēdumi izveido atkārtojamu “standartizētu matricu” un nav nepieciešams atrast nepiesārņotus un tīrus nosēdumu avotus,
 - testēšanu var sākt jebkurā laikā, nesaskaroties ar sezonālu mainību testēšanas nosēdumos, un nav nepieciešams nosēdumus iepriekš apstrādāt, lai tos attīrītu no vietējās faunas, turklāt izstrādātu nosēdumu izmantošana samazina izmaksas, kas saistītas ar pietiekamu nosēdumu daudzumu savākšanu dabā regulāras testēšanas vajadzībām,
 - izstrādātu nosēdumu izmantošana ļauj salīdzināt toksicitāti un attiecīgi klasificēt vielas.
6. Definīcijas dotas 1. papildinājumā.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

7. Vispirms hironomiņu kāpurus jebkurā attīstības stadijā pakļauj testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju diapazona iedarbībai nosēdumu un ūdens sistēmās. Nosēdumus piesātina ar testējamo ķīmisko vielu un pēc tam pirmās attīstības stadijas kāpurus ievieto testēšanas vārglāzēs, kurās nostabilizējušās nosēdumu un ūdens koncentrācijas. Hironomiņu izšķīšanos un attīstības ātrumu mēra testēšanas beigās. Kāpuru izdzīvošanu un svaru var noteikt jau pēc 10 dienām, ja vajadzīgs (izmantojot papildu atkārtojumus pēc vajadzības). Šos datus analizē, vai nu izmantojot regresijas modeli, lai aplēstu koncentrāciju, kas izraisītu $\times$ % samazinājumu attiecībā uz izšķīšanos vai kāpuru izdzīvošanu vai augšanu (piemēram, EC_{15} , EC_{50} utt.), vai izmantojot statistiskās hipotēzes testu, lai noteiktu koncentrācijas līmeni, pie kura nav novērojama ietekme (NOEC) / koncentrācijas līmeni, pie kura novērojama mazākā ietekme (LOEC). Statistiskās hipotēzes testam ir nepieciešams salīdzināt ietekmes vērtības ar kontroles vērtībām, izmantojot statistiskus testus.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

8. Ir jābūt zināmai testējamās ķīmiskās vielas šķīdībai ūdenī, tās tvaika spiedienam, izmērītajai vai aprēķinātajai daļai nosēdumos un stabilitātei ūdenī un nosēdumos. Jābūt pieejamai uzticamai analītiskajai metodei, ar ko būtu iespējams kvantificēt testējamo ķīmisko vielu ūdens virsējā slānī, porūdenī un nosēdumos ar zināmu un apstiprinātu precizitāti un noteikšanas ierobežojumu. Lietderīga informācija ietver testējamās ķīmiskās vielas struktūrformulu un tīrību. Tāpat lietderīgi ir zināt testējamās vielas ķīmisko sadalīšanos (piemēram, izkliedēšanās, abiotiskā un biotiskā noārdīšanās utt.). Papildu norādījumi par tādu vielu testēšanu, kuras ir sarežģīti testēt to fizikālo un ķīmisko īpašību dēļ, pieejami atsaucē (12).

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

9. Periodiski var testēt ķīmiskās standartvielas, lai pārliacinātos, ka testēšanas protokols un apstākļi ir uzticami. Toksisko standartvielu, kas sekmīgi izmantotas salīdzinošajos testos un validēšanas pētījumos, piemēri ietver lindānu, trifluralīnu, pentahlorfenolu, kadmija hlorīdu un kālija hlorīdu (1) (2) (5) (6) (13).

TESTA DERĪGUMS

10. Lai tests būtu derīgs, piemēro šādus nosacījumus:
 - izšķīšanās apmēram kontroles traukos jābūt vismaz 70 % testēšanas beigās (1) (6),
 - *C. riparius* un *C. yoshimatsui* izšķīšanās līdz pieaugušiem īpatņiem no kontroles traukiem jānotiek 12–23 dienu laikā pēc to ievietošanas traukos; *C. tentans* ir vajadzīgas 20–65 dienas,

- testēšanas beigās katrā traukā jānosaka pH un izšķīdušā skābekļa koncentrācija; skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības (turpmāk – ASV) izmantotajā temperatūrā, savukārt pH ūdens virsējā slānī jābūt 6–9 diapazonā visos testēšanas traukos,
- ūdens temperatūra nedrīkstētu atšķirties vairāk kā par $\pm 1,0$ °C; ūdens temperatūru varētu kontrolēt ar izotermisku telpu, un tādā gadījumā temperatūra telpā ir jāapstiprina atbilstīgos laika intervālos.

METODES APRAKSTS

Testēšanas trauki

11. Pētījumu veic 600 ml stikla vārglāzēs ar 8 cm diametru. Der arī citi trauki, bet tiem jānodrošina piemērots ūdens virsējā slāņa un nosēdumu dziļums. Nosēdumu virsmas jābūt pietiekamai, lai nodrošinātu 2–3 cm² telpu katram kāpuram. Nosēdumu slāņa dziļuma attiecībai pret ūdens virsējā slāņa dziļumu jābūt 1:4. Testēšanas traukiem un citām iekārtām, kas saskarsies ar testēšanas sistēmu, jābūt pilnībā izgatavotām no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla (piemēram, teflona).

Sugu izvēle

12. Testēšanā vēlams izmantot sugu *Chironomus riparius*. Arī *Chironomus tentans* ir piemēroti, bet grūtāk apstrādājami, un tiem vajadzīgs ilgāks testēšanas periods. Var izmantot arī *Chironomus yohimatsui*. Sīka informācija par kultūru metodēm attiecībā uz *Chironomus riparius* ir sniegta 2. papildinājumā. Informācija par kultūras apstākļiem ir pieejama arī attiecībā uz citām sugām, t. i., *Chironomus tentans* (4) un *Chironomus yohimatsui* (11). Sugu noteikšana ir jāapstiprina pirms testēšanas, bet nav vajadzīga pirms katras testēšanas reizes, ja organismi ir iegūti no laboratorijā kultivētas kultūras.

Nosēdumi

13. Vēlams izmantot izstrādātus nosēdumus (saukti arī par rekonstituētajiem, mākslīgajiem vai sintētiskajiem nosēdumiem). Tomēr, ja izmanto dabīgos nosēdumus, tie ir jāraksturo (vismaz pH, organiskā oglekļa sastāvs, ieteicama arī tādu citu parametru noteikšana kā C/N attiecība un granulometrija) un tajos nedrīkstētu būt nekāda piesārņojuma un citu organismu, kas varētu konkurēt ar hironomīdiem vai baroties ar tiem. Ieteicams arī pirms izmantošanas hironomīdu toksicitātes testā dabīgos nosēdumus kondicionēt septiņas dienas tādos pašos apstākļos, kādi pastāvēs testēšanas laikā. Šajā testā (1) (15) (16) ir ieteicams izmantot šādus izstrādātus nosēdumus, par pamatu izmantojot mākslīgu augsni, ko izmanto C.8. testēšanas metodē (14):
 - a) 4–5 % (saussvars) kūdras – pēc iespējas pietuvināta pH 5,5–6,0 apmērā; ir svarīgi izmantot pulverizētu kūdru, kas smalki samalta (daļiņu izmērs ≤ 1 mm) un kas ir izžāvēta vienīgi ar gaisu;
 - b) 20 % (saussvars) kaolīna mālu (kaolīnīta saturam vēlams būt virs 30 %);
 - c) 75–76 % (saussvars) kvarca smilšu (pārsvārā tām jāsatāv no smalkām smiltīm, proti, vairāk nekā 50 % daļiņu jābūt 50–200 μ m izmērā);
 - d) pievieno dejonizētu ūdeni, lai iegūtu galīgā maisījuma mitruma saturu 30–50 % diapazonā;
 - e) pievieno ķīmiski tīras kvalitātes kalcija karbonātu (CaCO_3), lai koriģētu galīgā nosēdumu maisījuma pH $7,0 \pm 0,5$ apmērā; galīgā maisījuma organiskā oglekļa saturam jābūt 2 % ($\pm 0,5$), un tas jākoriģē, izmantojot atbilstīgus daudzumus kūdras un smilšu saskaņā ar a) un c) apakšpunktu.

14. Jābūt zināmam kūdras, kaolīna mālu un smilšu avotam. Nosēdumu sastāvdaļas ir jāpārbauda, lai pārliecinātos, ka tajās nav ķīmiska piesārņojuma (piemēram, smago metālu, hlororganisko savienojumu, fosfororganisko savienojumu utt.). Izstrādātu nosēdumu sagatavošanas piemērs ir aprakstīts 3. papildinājumā. Ir pieņemami samaisīt arī sausas sastāvdaļas, ja tiek pierādīts, ka pēc ūdens virsējā slāņa pievienošanas nenotiek nosēdumu sastāvdaļu atdalīšanās (piemēram, kūdras daļiņu peldēšana pa ūdens virsmu) un ka kūdra vai nosēdumi ir pietiekami kondicionēti.

Ūdens

15. Jebkurš ūdens, kas atbilst 2. un 4. papildinājumā noteiktajiem pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskajiem raksturlielumiem, ir piemērots kā testēšanas ūdens. Jebkāds piemērots ūdens, proti, dabīgs ūdens (virszemes vai gruntsūdens), rekonstituēts ūdens (sk. 2. papildinājumu) vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors, ir izmantojams kā kultūras turēšanas un testēšanas ūdens, ja hironomīdi tajā bez stresa pazīmēm izdzīvo kultivēšanas un testēšanas laikā. Testēšanas sākumā testēšanas ūdens pH jābūt 6–9 diapazonā, savukārt kopējā cietība nedrīkst

pārsniegt 400 mg/l kā CaCO_3 . Tomēr, ja tiek prognozēta mijiedarbība starp cietības joniem un testējamo vielu, jāizmanto zemākas cietības ūdens (tādēļ šādā situācijā nedrīkst izmantot *Elendt* barotni M4). Visa pētījuma laikā jāizmanto viena veida ūdens. Ūdens kvalitātes raksturlielumi, kas uzskaitīti 4. papildinājumā, jānosaka vismaz divreiz gadā vai tad, kad ir aizdomas, ka šie raksturlielumi varētu būt būtiski izmainījušies.

Rezerves šķīdumi – piesātināti nosēdumi

16. Izraudzītās koncentrācijas piesātinātos nosēdumus parasti sagatavo, testējamās vielas šķīdumu tieši pievienojot nosēdumiem. Dejonizētā ūdenī izšķīdinātas testējamās vielas rezerves šķīdumu samaisa ar izstrādātajiem nosēdumiem, izmantojot velmēšanas dzirnavas, barības jaucēju vai manuālu jaukšanu. Ja testējamā viela ir ūdenī mazšķīstoša, to var izšķīdināt pēc iespējas mazākā tilpumā piemērota organiska šķīdinātāja (piemēram, heksāna, acetona vai hlороформа). Šo šķīdumu pēc tam samaisa ar 10 g smalku kvarca smilšu katram testēšanas traukam. Šķīdumam ļauj iztvaikot, un tam ir pilnībā jāpazūd no smiltīm. Pēc tam smiltis samaisa ar piemērotu daudzumu nosēdumu katrā testēšanas vārglāzē. Testējamās vielas šķīdināšanai, disperģēšanai vai emulgēšanai drīkst izmantot tikai tādus preparātus, kas viegli izgaist. Jāpatur prātā, ka testējamās vielas nodrošinātās smiltis un smilšu maisījums ir jāņem vērā, sagatavojot nosēdumus (t. i., tādēļ nosēdumi ir jāgatavo, izmantojot mazāk smilšu). Jāuzmanās, lai nodrošinātu, ka nosēdumiem pievienotā testējamā viela ir nosēdumos viscaur un vienmērīgi izkliedēta. Ja vajadzīgs, var analizēt paraugus, lai noteiktu homogenitātes pakāpi.

TESTĒŠANAS PLĀNS

17. Testēšanas plāns attiecas uz testēšanas koncentrāciju skaita un intervālu izvēli, trauku skaitu katram koncentrācijas līmenim un kāpuru skaitu traukā. Ir aprakstīti plāni ietekmes koncentrāciju (turpmāk – EC) punktu noteikšanai, NOEC noteikšanai un pieļaujamā daudzuma testēšanas veikšanai.

Regresijas analīzes plāns

18. Testēšanā izmantotajām koncentrācijām ir jāaptver ietekmes koncentrācija (piemēram, EC_{15} , EC_{50}) un koncentrāciju diapazons, kurā ir jānoskaidro testējamās vielas ietekme. Tas, ka ietekmes koncentrācija ir testēšanā izmantoto koncentrāciju diapazonā, parasti uzlabo ietekmes koncentrāciju (EC_x) noteikšanas precizitāti un it sevišķi derīgumu. Jāizvairās no ekstrapolācijas krietni zem zemākās pozitīvās koncentrācijas vai virs augstākās koncentrācijas. Ir lietderīgi veikt orientējošu diapazona noteikšanas testēšanu, lai izvēlētos izmantojamo koncentrāciju diapazonu (sk. 27. punktu).
19. Ja ir jānosaka EC_x , jātestē vismaz piecas koncentrācijas un trīs atkārtojumi katrai koncentrācijai. Jebkurā gadījumā ieteicams izmantot pietiekamu daudzumu testēšanas koncentrāciju, lai nodrošinātu modeli pamatotām aplēsēm. Koeficients starp koncentrācijām nedrīkstētu pārsniegt 2 (izņēmums varētu būt gadījumi, kad devu un atbildes reakcijas liknei ir sekls slīpums). Katras apstrādes atkārtojumu skaitu var samazināt, ja palielina testēšanas koncentrāciju skaitu ar dažādām atbildes reakcijām. Atkārtojumu skaita palielināšana vai testēšanas koncentrāciju intervālu samazināšana parasti noved pie šaurākiem testēšanas ticamības intervāliem. Ir vajadzīgi papildu atkārtojumi, ja kāpuru izdzīvošanu un augšanu nosaka jau pēc 10 dienām.

NOEC/LOEC noteikšanas plāns

20. Ja ir jānosaka LOEC vai NOEC, jāizmanto [iecas testēšanas koncentrācijas ar vismaz četrreiz atkārtojumiem un koeficients starp koncentrācijām nedrīkstētu pārsniegt 2. Atkārtojumu skaitam jābūt pietiekamam, lai nodrošinātu pietiekamu statistisko nozīmību un varētu konstatēt 20 % atšķirību no kontroles traukiem pie 5 % nozīmības līmeņa ($p = 0,05$). Attiecībā uz attīstības ātrumu parasti ir piemēroti veikt dispersijas analīzi (turpmāk – ANOVA), piemēram, *Dunnett* testu vai *Williams* testu (17) (18) (19) (20). Attiecībā uz izšķīlšanās koeficientu var izmantot *Cochran-Armitage*, *Fisher* pieeju (ar *Bonferroni* korekciju) vai *Mantel-Haenszel* testu.

Pieļaujamā daudzuma tests

21. Pieļaujamā daudzuma testu (1 testēšanas koncentrācija un kontroles trauks) var veikt, ja orientējošā diapazona noteikšanas testā netika konstatēta ietekme. Pieļaujamā daudzuma testa mērķis ir veikt testēšanu ar pietiekami augstu koncentrāciju, lai lēmumu pieņēmēji varētu izslēgt testējamās vielas iespējamu toksisku ietekmi, un pieļaujamo daudzumu nosaka tādā koncentrācijā, kādas iestāšanos neprognozē nekādā gadījumā. Ieteicams 1 000 mg/kg (saussvars). Parasti ir vajadzīgi vismaz seši atkārtojumi gan apstrādei, gan kontrolei. Ir jāpanāk pietiekama statistiskā nozīmība, lai varētu noteikt 20 % atšķirību no kontroles trauka pie 5 % nozīmības līmeņa ($p = 0,05$). Ar metrisku atbildes reakciju (attīstības ātrums un svārs) t-tests parasti ir piemērota statistiskā metode, ja dati atbilst šā testa prasībām (normalitāte, homogēnas dispersijas). Var izmantot nevienlīdzīgas dispersijas t-testu vai ar parametriem nesaistītu testu, piemēram, *Wilcoxon-Mann-Whitney* testu, ja nav atbilstības iepriekš norādītajām prasībām. Attiecībā uz izšķīlšanās koeficientu ir piemērota *Fisher* pieeja.

PROCEDŪRA

Ekspozīcijas apstākļi*Piesātinātās nosēdumu un ūdens sistēmas sagatavošana*

22. Testējamās vielas pievienošanai ir ieteicams izmantot testēšanas C.8. metodē "Toksisitātes noteikšana sliekām" aprakstīto piesātināšanas procedūru (14). Piesātinātos nosēdumus ievieto traukos un pievieno ūdens virsējo slāni, lai izveidotu nosēdumu un ūdens tilpuma attiecību 1:4 (sk. 11. un 15. punktu). Nosēdumu slāņa dziļumam jābūt 1,5–3 cm. Lai izvairītos no nosēdumu sastāvdaļu atdalīšanās un smalku daļiņu atkārtotas suspensijas ūdens stabā testēšanas ūdens pievienošanas laikā, nosēdumus var pārklāt ar plastmasas ripu ūdens uzliešanas laikā, bet pēc tam ripu nekavējoties noņemt. Šim nolūkam der arī citas ierīces.
23. Testēšanas trauki ir jāapsedz (piemēram, ar stikla plāksnēm). Ja vajadzīgs, pētījuma laikā ūdens līmeņus papildina līdz sākotnējam tilpumam, lai kompensētu ūdens iztvaikošanu. Tam jāizmanto destilēts vai dejonizēts ūdens, lai novērstu sāļu uzkrāšanos.

Stabilizācija

24. Tiklīdz ir sagatavoti piesātinātie nosēdumi ar ūdens virsējo slāni, ir vēlams ļaut testējamai vielai nodalīties no ūdens fāzes un nogulsnēties uz nosēdumiem (3) (4) (6) (13). To vēlams īstenot tādos pašos temperatūras un aerācijas apstākļos, kādus izmanto testēšanā. Atbilstīgais līdzsvara iestāšanās laiks ir atkarīgs no konkrētajiem nosēdumiem un ķīmiskās vielas un var būt stundas vai dienas un retos gadījumos ilgt līdz pat vairākām nedēļām (4–5 nedēļas). Tā kā šajā laikā varētu noārdīties daudzas ķīmiskās vielas, līdzsvara iestāšanās netiek gaidīta, bet līdzsvarošanai ir ieteicams dot 48 stundas. Šā turpmākas līdzsvarošanās perioda beigās ir jānosaka testējamās vielas koncentrācija ūdens virsējā slānī, porūdenī un nosēdumos, proti, vismaz augstākā un zemākā koncentrācija (sk. 38. punktu). Šie testējamās vielas analītiskie mērījumi ļauj aprēķināt masas bilanci un noteikt rezultātus, pamatojoties uz izmērītajām koncentrācijām.

Testēšanas organismu pievienošana

25. Četras līdz piecas dienas pirms testa organismu pievienošanas testēšanas traukos no kultūrām jāizņem oliņas un tās jāievieto nelielos traukos ar audzēšanas barotni. Var izmantot noturētu barotni no rezerves kultūras vai svaigi sagatavotu barotni. Ja izmanto svaigi sagatavotu barotni, kultūras barotnei jāpievieno neliels daudzums barības, piemēram, zaļāļģes un/vai daži pilieni filtrāta no smalki samaltas zivju barības pārslu suspensijas (sk. 2. papildinājumu). Jāizmanto tikai svaigi izdētas oliņas. Parasti kāpuri sāk šķīties dažas dienas pēc oliņu izdēšanas (2–3 dienas *Chironomus riparius* 20 °C un 1–4 dienas *Chironomus tentans* 23 °C un *Chironomus yoshimatsu* 25 °C), un kāpuru augšana notiek četrās attīstības stadijās, no kurām katra ilgst 4–8 dienas. Testēšanā jāizmanto pirmās attīstības stadijas kāpuri (2–3 vai 1–4 dienas pēc izšķīlšanās). Knišu attīstības stadiju var pārbaudīt, izmantojot galvas kapsulas platumu (6).
26. Katrā testēšanas traukā ar piesātinātiem nosēdumiem un ūdeni pēc nejaušības principa ievieto 20 pirmās attīstības stadijas kāpurus, izmantojot neasu pipeti. Kāpuru ievietošanas laikā testēšanas traukos ir jāpārtrauc ūdens aerācija, un šis pārtraukums jāturpina vēl 24 stundas pēc kāpuru ielaišanas (sk. 25. un 32. punktu). Saskaņā ar izmantoto testēšanas plānu (sk. 19. un 20. punktu) izmantoto kāpuru skaits uz katru koncentrāciju ir vismaz 60, lai noteiktu EC punktus, un 80, lai noteiktu NOEC.

Testēšanas koncentrācijas

27. Diapazona noteikšanas tests varētu būt lietderīgs, lai noteiktu koncentrāciju diapazonu galīgajam testam. Šim nolūkam izmanto virkni atšķirīgu testējamās vielas koncentrāciju. Lai hironomīdiem nodrošinātu tādu pašu virsmas blīvumu, kādu izmantos galīgajā testēšanā, hironomīdus pakļauj katras testējamās vielas koncentrācijas iedarbībai uz tādu laiku, kas ļauj aplēst aptuvenās testēšanas koncentrācijas. Atkārtojumi nav vajadzīgi.
28. Lēmumu par testēšanas koncentrācijām galīgajam testam pieņem, pamatojoties uz diapazona noteikšanas testa rezultātiem. Jāizmanto un saskaņā ar 18.–20. punktu jāizvēlas vismaz piecas koncentrācijas.

Kontroles trauki

29. Testā ir jāietver kontroles trauki, kuros nav testējamās vielas, bet ir nosēdumi un kuriem nodrošina atbilstīgu skaitu atkārtojumu (sk. 19. un 20. punktu). Ja testējamās vielas pievienošanai ir izmantots šķīdums (sk. 16. punktu), jāizmanto arī nosēdumu šķīduma kontroles trauks.

Testēšanas sistēma

30. Izmanto statistiskas sistēmas. Izņēmuma gadījumos, piemēram, ja ūdens kvalitātes specifikācijas nav piemērotas testa organismam vai ietekmē ķīmisko līdzsvaru (piemēram, izšķīdušā skābekļa līmeņi pārmērīgi pazeminās, izvadproduktu koncentrācija pārmēru paaugstinās vai no nosēdumiem ekstrahējas minerāli un ietekmē pH un/vai ūdens cietību), var izmantot daļēji statistiskas vai caurplūdes sistēmas ar ūdens virsējā slāņa periodisku vai nepārtrauktu atjaunošanu. Tomēr parasti derēs un ir ieteicamas citas ūdens virsējā slāņa kvalitātes uzlabošanas metodes, piemēram, aerācija.

Barība

31. Kāpuri ir jābaro, vēlams, katru dienu vai vismaz trīs reizes nedēļā. Katram jaunam kāpuram pirmās 10 dienas pietiek ar zivju barību (suspensija ūdenī vai smalki samalta barība, piemēram, *TetraMin* vai *TetraPhyll*, sk. 2. papildinājumu) 0,25–0,5 mg apmērā (0,35–0,5 mg *C. yoshimatus*). Nedaudz vairāk barības varētu vajadzēt vecākiem kāpuriem, proti, 0,5–1 mg uz kāpuru dienā, ar ko vajadzētu pietikt līdz testēšanas beigām. Ja tiek novērota sēnīšu augšana vai ja kontroles traukos ir novērota mirstība, barības porcija ir jāsamazina visos apstrādes traukos un kontroles traukos. Ja sēnīšu vairošanās neizdodas apturēt, tests ir jāatkārto. Ja tiek testētas vielas, kam ir spēcīga adsorbēšanās spēja (piemēram, ar $\log K_{ow} > 5$) vai kas izveido homopolāru saitī ar nosēdumiem, barības daudzumu, kurš vajadzīgs organismu izdzīvošanas un dabīgas augšanas nodrošināšanai, var pievienot izstrādātajiem nosēdumiem pirms stabilizācijas perioda. Šādam nolūkam jāizmanto augu materiāls, nevis zivju barība, proti, var pievienot 0,5 % (saussvars) smalki samaltas lapas, piemēram, nātres (*Urtica dioica*), zīdkoka (*Morus alba*), baltā āboliņa (*Trifolium repens*) vai spinātu (*Spinacia oleracea*) lapas, vai citu augu materiālu (*Cerophyl* vai alfa-celulozi).

Inkubācijas apstākļi

32. Kad ir pagājušas, vēlams, 24 stundas pēc kāpuru ielaišanas, testēšanas traukos ūdens virsējam slānim nodrošina lēnu aerāciju, ko turpina visā testēšanas laikā (jāuzmanās, lai izšķīdušā skābekļa koncentrācija nepazeminās zem 60 % no ASV). Aerāciju nodrošina caur stikla Pastēra pipeti, kas piestiprināta 2–3 cm virs nosēdumu slāņa (t. i., vienu vai dažus burbulus sekundē). Testējot gaistošas ķīmiskās vielas, var apsvērt iespēju nosēdumu un ūdens sistēmai aerāciju nenodrošināt.
33. Testēšanu veic nemainīgā 20 °C (± 2 °C) temperatūrā. *C. tentans* un *C. yoshimatus* ieteicamā temperatūra ir attiecīgi 23 °C un 25 °C (± 2 °C). Piemēro 16 stundu apgaismojuma ilgumu, un gaismas intensitātei jābūt 500–1 000 luksiem.

Ekspozīcijas ilgums

34. Ekspozīcija sākas brīdī, kad kāpuri tiek ielaisti piesātinātajos un kontroles traukos. Maksimālais ekspozīcijas ilgums ir 28 dienas *C. riparius* un *C. yoshimatus* un 65 dienas *C. tentans*. Ja kniši izšķīļas ātrāk, testēšanu var pārtraukt ne mazāk kā pēc piecām dienām pēc pēdējā pieaugušā īpatņa izšķīlšanās kontroles traukā.

Novērojumi*Izšķīlšanās*

35. Nosaka pilnībā izšķīlušos knišu tēviņu un mātīšu attīstības laiku un kopējo skaitu. Tēviņus ir viegli atšķirt pēc to spalvainās antenas.
36. Testēšanas trauki ir jānovēro vismaz trīs reizes nedēļā, lai vizuāli novērtētu jebkādas anomālijas (piemēram, nosēdumu pamešana, neparasta peldēšana) salīdzinājumā ar kontroles traukiem. Paredzamās izšķīlšanās periodā katru dienu jāskaita izšķīlušies kniši. Katru dienu reģistrē pilnībā izšķīlušos knišu dzimumu un skaitu. Pēc identifikācijas knišus izņem no traukiem. Oliņas, kas izdētas pirms testēšanas pabeigšanas, ir jāreģistrē un jāizņem, lai novērstu kāpuru atjaunošanos nosēdumos. Jāreģistrē arī redzamo kūniņu skaits, kuras nav izšķīlušas. Norādījumi par izšķīlšanās mērīšanu ir sniegti 5. papildinājumā.

Augšana un izdzīvošana

37. Ja ir jāsniedz dati par kāpuru izdzīvošanu un augšanu pēc 10 dienām, sākumā jāietver papildu testēšanas trauki, lai tos varētu izmantot šim nolūkam. Šo papildu trauku nosēdumus izkāš, izmantojot 250 µm sietu, lai saglabātu kāpurus. Nāves kritēriji ir nekustīgums vai atbildes reakcijas trūkums uz mehānisku kairinājumu. Neatgūtie kāpuri arī jāuzskata par mirušiem (kāpurs, kas nomiruši testēšanas sākumā, iespējams, ir noārdījuši mikrobi). Nosaka izdzīvojušo kāpuru saussvaru (bez pelniem) katrā testēšanas traukā un aprēķina vidējo atsevišķo sausvaru katrā traukā. Ir lietderīgi noteikt, kurai attīstības stadijai pieder izdzīvojušais kāpurs. Šim nolūkam var izmantot katra īpatņa galvas kapsulas platuma mērījumu.

Analītiskie mērījumi

Testējamās vielas koncentrācija

38. Pirms testēšanas sākšanas (t. i., pirms kāpuru ielaišanas) vismaz no viena katras koncentrācijas trauka paņem nosēdumu kopējos paraugus, lai analītiski noteiktu testējamās vielas koncentrāciju nosēdumos. Ir ieteicams testēšanas sākumā (sk. 24. punktu) un beigās analizēt vismaz ūdens virsējā slāņa, porūdens un nosēdumu paraugus no augstākās un zemākās koncentrācijas. Šāda testējamās vielas koncentrācijas noteikšana sniedz informāciju par testējamās vielas attīstību/sadalīšanos ūdens un nosēdumu sistēmā.
39. Ja veic starpposma mērījumus (piemēram, septītajā dienā) un ja analīzei ir vajadzīgi lieli paraugi, ko nevar paņemt no testēšanas traukiem, neietekmējot testēšanas sistēmu, jāveic analītiska noteikšana no paraugiem, kuri ņemti no papildu testēšanas traukiem, kas saņēmuši tādu pašu apstrādi (ietverot testa organismus), bet netiek izmantoti bioloģiskajiem novērojumiem.
40. Lai izolētu starpūdeni, ieteicama centrifugēšana, piemēram, 10 000 g 4 °C temperatūrā 30 minūtes. Tomēr, ja tiek pierādīts, ka testējamā viela neadsorbējas uz filtriem, var būt pieņemami izmantot arī filtrēšanu. Dažos gadījumos var būt neiespējami analizēt koncentrācijas porūdenī, jo parauga izmērs ir pārāk mazs.

Fizikālie un ķīmiskie parametri

41. Atbilstīgi ir jānosaka testēšanas trauku pH un temperatūra (sk. 10. punktu). Testēšanas sākumā un beigās jānosaka arī cietība un amonjaks kontroles traukos un vienā testēšanas traukā ar augstāko koncentrāciju.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

42. Šā testa mērķis ir noteikt testējamās vielas ietekmi uz attīstības ātrumu un pilnībā izšķīlušos kniņu tēviņu un mātīšu kopējo skaitu vai – 10 dienu testa gadījumā – ietekmi uz kāpuru izdzīvošanu un svaru. Ja nav nekādu norāžu par statistiski atšķirīgu jutību atkarībā no dzimuma, tēviņu un mātīšu rezultātus var apvienot, lai veiktu statistisko analīzi. Jutības atšķirības starp dzimumiem var statistiski novērtēt, piemēram, ar $\chi^2 - r \times 2$ testu. Ja vajadzīgs, pēc 10 dienām ir jānosaka kāpuru izdzīvošana un vidējais atsevišķais saussvars katrā traukā.
43. Ietekmes koncentrācijas, kas izteiktas saussvarā un pamatotas uz to, vēlams aprēķināt, pamatojoties uz izmērtajām koncentrācijām nosēdumos testēšanas sākumā (sk. 38. punktu).
44. Lai aprēķinātu punktu aplēsi EC_{50} vai jebkurai citai EC_x , kā patiesus atkārtojumus var izmantot statistiku par situāciju pirms ievietošanas traukos. Aprēķinot ticamības intervālu jebkurai EC_x , jāņem vērā mainība starp traukiem vai ir jāpierāda, ka šī mainība ir tik maza, ka to var neņemt vērā. Ja modeli aprīko saskaņā ar mazāko kvadrātu metodi, statistika par situāciju pirms ievietošanas traukos ir jākorrigē, lai uzlabotu mainības homogenitāti. Tomēr EC_x vērtības ir jāaprēķina pēc tam, kad atbildes reakcija ir atkoriģēta atpakaļ uz sākotnējo vērtību.
45. Ja statistiskās analīzes mērķis ir noteikt NOEC/LOEC ar hipotēzes testu, jāņem vērā mainība starp traukiem, piemēram, ar ielīdzdotu ANOVA. Var arī izmantot stabilākus testus (21) situācijās, kad ir pārkāpti parastie ANOVA pieņēmumi.

Izšķilšanās koeficients

46. Izšķilšanās koeficienti ir kvantitatīvi dati, ko var analizēt ar Cochran-Armitage testu, kuru īsteno pakāpeniski, ja ir paredzama monotona devas un atbildes reakcijas attiecība un ja šie dati atbilst šādai prognozei. Ja minētais tests analīzei neder, var izmantot Fisher pieeju vai Mantel-Haenszel testu ar Bonferroni-Holm koriģētajām p-vērtībām. Ja pastāv liecības par lielāku mainību starp atkārtojumiem ar vienu un to pašu koncentrāciju, nekā to norādītu binomināls sadalījums (nereti uz to atsaucas kā uz "papildu binominālu" mainību), tad jāizmanto stabils Cochran-Armitage vai Fisher pieejas tests, kā ierosināts atsaucē (21).

Nosaka katrā traukā izšķīlušos kniņu summu (n_e), ko dala ar ielaisto kāpuru skaitu (n_a):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kur:

ER = izšķilšanās koeficients;

n_e = katrā traukā izšķīlušos knišļu skaits;

n_a = katrā traukā ielaisto kāpuru skaits.

47. Lieliem paraugu apjomiem piemērota alternatīva, ja pastāv papildu binomināla mainība, ir iespēja izšķilšanās koeficientu uzskatīt par nepārtrauktu atbildes reakciju un izmantot tādas procedūras kā *William* tests, ja ir paredzama monotona devas un atbildes reakcijas attiecība un ja tas atbilst šiem izšķilšanās koeficienta datiem. *Dunnnett* tests būtu piemērots, ja monotonuma nav. Šajā kontekstā liels parauga apjoms tiek definēts kā gadījums, kad gan izšķīlušos īpatņu skaits, gan neizšķīlušos īpatņu skaits pārsniedz piecus katrā atkārtojumā (traukā).
48. Lai piemērotu ANOVA metodes, izšķilšanās koeficienta vērtības ir vispirms jāpārvērš ar *arcsin* kvadrātsaknes transformāciju vai ar *Freeman-Tukey* transformāciju, lai iegūtu aptuveno normālo sadalījumu un izlīdzinātu mainības. Izmantojot absolūto periodiskumu, var piemērot *Cochran-Armitage*, *Fisher* pieejas (*Bonferroni*) vai *Mantel-Haenszel* testus. *Arcsin* kvadrātsaknes transformāciju piemēro, ņemot izšķilšanās koeficienta kvadrātsaknes inverso sinus ($\sin^{-1}$).
49. Izšķilšanās koeficientiem EC_x vērtības aprēķina, izmantojot regresijas analīzi (vai, piemēram, *probit* (22), *logit*, *Weibull*, atbilstīgu tirdzniecībā pieejamu programmatūru utt.). Ja regresijas analīze ir nesekmīga (piemēram, tiek iegūtas mazāk nekā divas daļējas atbildes reakcijas), izmanto citas ar parametriem nesaistītas metodes, tādas kā slidošā vidējā vai vienkāršā interpolācija.

Attīstības ātrums

50. Vidējais attīstības laiks ir vidējais laikposms starp kāpuru ielaišanu (testa 0. diena) un testa knišļu izšķilšanos. (Lai aprēķinātu patieso attīstības laiku, jāapsver kāpuru vecums ielaišanas brīdī.) Attīstības ātrums ir attīstības laika apgriezītā vērtība (vienība: 1/diena) un ir kāpuru vienas dienas attīstības daļa. Attīstības ātrums ir ieteicamāks, lai novērtētu šos nosēdumu toksicitātes pētījumus, jo tā mainība ir mazāka un tas ir homogēnāks un tuvāks normālam sadalījumam salīdzinājumā ar attīstības laiku. Tādējādi efektīvas parametru testēšanas procedūras var izmantot drīzāk ar attīstības ātrumu, nevis ar attīstības laiku. Attiecībā uz attīstības ātrumu kā nepārtrauktu atbildes reakciju EC_x vērtības var aplēst, izmantojot regresijas analīzi (piemēram, (23) (24)).
51. Turpmākajiem statistiskajiem testiem pieņem, ka pārbaudes dienā $\times$ novēroto knišļu skaits ir izšķīlies vidējā laika intervālā starp dienu $\times$ un dienu $\times - 1$ (l = pārbaudes intervāla ilgums, parasti viena diena). Katrā traukā vidējo attīstības ātrumu ($\bar{x}$) aprēķina šādi:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^m f_i x_i}{n_e}$$

kur:

$\bar{x}$: vidējais attīstības ātrums katrā traukā;

i : pārbaudes intervāla indekss;

m : pārbaudes intervālu maksimālais skaits;

f_i : pārbaudes intervālā i izšķīlušos knišļu skaits;

n_e : kopējais knišļu skaits, kas izšķīlušies eksperimenta beigās; ($= \sum f_i$)

x_i : intervālā i izšķīlušos knišļu attīstības ātrums.

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{day}_i - \frac{1}{2}\right)}$$

kur:

day_i : pārbaudes diena (dienas kopš ielaišanas);

l_i : pārbaudes intervāla i ilgums (dienas, parasti viena diena).

Testēšanas pārskats

52. Testēšanas pārskatā jāietver vismaz šāda informācija:

Testējamā viela:

- fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikāli ķīmiskās īpašības (šķīdība ūdenī, tvaika spiediens, sadalīšanās koeficients augsnē (vai nosēdumos, ja pieejams), stabilitāte ūdenī utt.),
- ķīmiskās identifikācijas dati (vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums, struktūrformula, CAS numurs utt.), ietverot tīrību un analītisko metodi, ar ko ir iespējams kvantificēt testējamo vielu.

Testēšanas sugas:

- izmantotie testa dzīvnieki: suga, zinātniskais nosaukums, organismu avots un pavairošanas apstākļi,
- informācija par oļiņu un kāpuru apstrādi,
- testa dzīvnieku vecums ielaišanas brīdī testēšanas traukos.

Testēšanas apstākļi:

- izmantotie nosēdumi, t. i., dabīgi vai izstrādāti nosēdumi,
- dabīgajiem nosēdumiem – nosēdumu paraugu ņemšanas vietas atrašanās vieta un apraksts, ietverot, ja iespējams, piesārņojuma vēsturi; raksturlielumi – pH, organiskā oglekļa saturs, C/N attiecība un granulometrija (ja vajadzīgs),
- izstrādāto nosēdumu sagatavošana: sastāvdaļas un raksturlielumi (organiskā oglekļa saturs, pH, mitrums utt. testēšanas sākumā),
- testēšanas ūdens sagatavošana (ja izmanto rekonstituētu ūdeni) un raksturlielumi (skābekļa koncentrācija, pH, vadītspēja, cietība utt. testēšanas sākumā),
- nosēdumu un ūdens virsējā slāņa dziļums,
- ūdens virsējā slāņa un porūdens tilpums; mitru nosēdumu svars ar porūdeni un bez tā;
- testēšanas trauki (materiāls un izmērs),
- nosēdumu piesātināšanas metode: izmantotās testēšanas koncentrācijas, atkārtojumu skaits un šķīdums, ja tas izmantots,
- piesātinātās nosēdumu un ūdens sistēmas stabilizēšanās līdzsvara fāze: ilgums un apstākļi,
- inkubācijas apstākļi: temperatūra, apgaismojuma cikls un intensitāte, aerācija (regularitāte un intensitāte),
- sīka informācija par barošanu, arī par barības veidu, sagatavošanu, daudzumu un barošanas režīmu.

Rezultāti:

- testēšanas nominālās koncentrācijas, izmērītās testēšanas koncentrācijas un visu analīžu rezultāti, lai noteiktu testējamās vielas koncentrāciju testēšanas traukā,
- ūdens kvalitāte testēšanas traukos, t. i., pH, temperatūra, izšķīdušais skābeklis, cietība un amonjaks,
- iztvaikojušā testēšanas ūdens aizvietošana, ja tā veikta,
- izšķīlušos kniņu tēviņu un mātīšu skaits katrā traukā un katru dienu,
- to kāpuru skaits katrā traukā, kas neizšķīlās par knišiem,
- kāpuru vidējais atsevišķais saussvars katrā traukā un katrā attīstības stadijā, ja vajadzīgs,
- izšķīlšanās īpatsvars katrā atkārtojumā un testēšanas koncentrācijā (kniņu tēviņu un mātīšu datus apvieno),

- pilnībā izšķīlušos kniņu vidējais attīstības ātrums katrā atkārtojumā un apstrādes līmenī (kniņu tēviņu un mātiņu datus apvienojot),
- toksisko mērķparametru aplēses, piemēram, EC_x (un saistītie ticamības intervāli), NOEC un/vai LOEC, kā arī to noteikšanai izmantotās statistiskās metodes,
- rezultātu apspriešana, arī ietekme uz testēšanas rezultātiem, kuru rada atkāpes no šīs testēšanas metodes.

LITERATŪRA

- (1) BBA (1995). Long-term toxicity test with *Chironomus riparius*: Development and validation of a new test system. Edited by M. Strelke and H.Köpp. Berlin 1995.
- (2) Fleming R *et al.* (1994). Sediment Toxicity Tests for Poorly Water-Soluble Substances. Final Report to the 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.
- (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) Šā pielikuma C.8. nodaļa "Toksicitātes noteikšana sliekām".
- (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. Statist. 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.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Šajā testēšanas metodē ir izmantoti šādi termini:

Izstrādāti nosēdumi jeb rekonstituēti, mākslīgi vai sintētiski nosēdumi ir tādu materiālu maisījums, ko izmanto, lai imitētu dabīgu nosēdumu fizikālās sastāvdaļas.

Ūdens virsējais slānis ir ūdens, ar ko nosegti nosēdumi testēšanas traukā.

Starpūdens jeb porūdens ir ūdens, kas aizņem telpu starp nosēdumiem un augsnes daļiņām.

Piesātināti nosēdumi ir nosēdumi, kam pievienota testējamā viela.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

2. papildinājums

Ieteikumi attiecībā uz *Chironomus riparius* kultūru

1. *Chironomus* kāpurus var audzēt kristalizācijas traukos vai lielākās tvertnēs. Smalkas kvarca smiltis izklāj plānā, aptuveni 5–10 mm slānī tvertnes apakšā. Ir pierādīts arī, ka var kā piemērotu substrātu izmantot *Kieselguhr* (piemēram, Merck, 8117. pants) (pietiek ar plānāku slāni tikai dažu mm augstumā). Pēc tam pievieno piemērotu ūdeni, lai dziļums būtu vairāki centimetri. Ūdens līmenis ir jāpaaugstina pēc vajadzības, lai aizvietotu iztvaikoto daudzumu un novērstu izžūšanu. Ūdeni var apmainīt, ja vajadzīgs. Jānodrošina lēna aerācija. Kāpuru audzēšanas trauki jātur piemērotā būrī, kas nepieļaus izšķīlušos pieaugušo īpatņu izbēgšanu. Būrim jābūt pietiekami lielam, lai būtu iespējama izšķīlušos pieaugušo īpatņu spietošana, pretējā gadījumā nenotiks kopulācija (ne mazāks kā apm. 30 × 30 × 30 cm).
2. Būri jātur istabas temperatūrā vai nemainīgas vides telpā 20 ± 2 °C ar 16 stundu apgaismojuma periodu (intensitāte apm. 1 000 luksi) un 8 stundu tumsas periodu. Ir norādīts, ka gaisa mitrums zem 60 % RH var kavēt reprodukciju.

Ūdens atšķaidīšanai

3. Var izmantot jebkuru piemērotu dabīgu vai sintētisku ūdeni. Bieži izmanto akas ūdeni, krāna ūdeni, no kura attīrīts hlors, un mākslīgas barotnes (piemēram, *Elenit* M4 vai M7 barotni, sk. turpmāk). Ūdenim pirms izmantošanas jānodrošina aerācija. Ja vajadzīgs, kultūras ūdeni var atjaunot, izmantoto ūdeni no kultivēšanas traukiem uzmanīgi nolējot vai sifonējot, nesadragājot kāpuru kūniņas.

Kāpuru barošana

4. *Chironomus* kāpuri ir jābaro ar zivju barības pārslām (*TetraMin*®, *TetraPhyll*® vai citu līdzīga zīmola patentētu zivju barību), katrā traukā dienā ievietojot aptuveni 250 mg. Barību var dot kā sausu samaltu pulveri vai kā suspensiju ūdenī, proti, 1,0 g barības pārslu pievieno 20 ml destilēta ūdens un samaisa, līdz iegūst homogēnu maisījumu. Šo sagatavi var izbarot aptuveni 5 ml apmērā katrā traukā katru dienu (pirms lietošanas sakratīt). Vecāki kāpuri var saņemt vairāk barības.
5. Barošanu pielāgo atbilstīgi ūdens kvalitātei. Ja kultivēšanas barotne kļūst duļķaina, barošana ir jāsamazina. Barības papildinājumi ir rūpīgi jāuzrauga. Pārāk maz barības izraisīs kāpuru emigrāciju vertikālā ūdens slāņa virzienā, savukārt pārāk daudz barības izraisīs mikrobu aktivitātes pieaugumu un samazinās skābekļa koncentrācijas. Abas situācijas var novest pie mazākiem augšanas ātrumiem.
6. Izveidojot jaunus kultivēšanas traukus, var pievienot dažas zaļālgū (piemēram, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) šūnas.

Izšķīlušos pieaugušo īpatņu barošana

7. Dažos testos ir iegūtas liecības, ka kokvilnas spilventiņš, kas piesūcināts ar piesātinātu saharozes šķīdumu, var nodrošināt barību izšķīlušiem pieaugušiem īpatņiem.

Izšķīlšanās

8. Divdesmit grādu ± 2 °C temperatūrā pieaugušie īpatņi sāks šķīsties no kāpuru audzēšanas traukiem aptuveni pēc 13–15 dienām. Tēviņus ir viegli atšķirt pēc to spalvainās antenas.

Oliņas

9. Tiklīdz vairošanas būrī ir pieaugušie īpatņi, visi kāpuru audzēšanas trauki ir jāpārbauda trīs reizes nedēļā, lai konstatētu izdētās želatīnveidīgās oliņas. Ja tās tiek atklātas, oliņas ir uzmanīgi jāizņem. Tās ir jāievieto nelielā šķīvī, kurā ir vairošanās ūdens paraugs. Oliņas izmanto, lai izveidotu jaunus kultivēšanas traukus (piemēram, 2–4 oliņu kopas katrā traukā), vai tās izmanto toksicitātes testēšanā.
10. Pirmās attīstības stadijas kāpuriem ir jāizšķīļas pēc 2–3 dienām.

Jaunu kultivēšanas trauku izveide

11. Pēc tam, kad ir izveidotas kultūras, katru nedēļu vai retāk var izveidot jaunu kāpuru kultivēšanas trauku atkarībā no testēšanas prasībām un vecos traukus izņemt no būriem pēc pieaugušo īpatņu izšķīlšanās. Ar šādu sistēmu var nodrošināt regulāru pieaugušo īpatņu piegādi ar minimāliem pārvaldības pasākumiem.

Testēšanas šķīdumu M4 un M7 sagatavošana

12. *Elenđt* (1990. gads) ir aprakstījis M4 barotni. M7 barotni sagatavo tāpat kā M4 barotni, izņemot 1. tabulā norādītās vielas, kurām koncentrācijas M7 barotnē ir četras reizes mazākas nekā M4 barotnē. Pašlaik tiek gatavota publikācija par M7 barotni (*Elenđt*, individuāls paziņojums). Testēšanas šķīdumu nevajadzētu sagatavot saskaņā ar *Elenđt* un *Bias* (1990. gads), jo $\text{NaSiO}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 un K_2HPO_4 koncentrācijas, kas norādītas rezerves šķīdumu sagatavošanai, ir nepiemērotas.

M7 barotnes sagatavošana

13. Katru rezerves šķīdumu (I) sagatavo atsevišķi un apvienoto rezerves šķīdumu (II) pagatavo no šiem rezerves šķīdumiem (I) (sk. 1. tabulu). Piecdesmit mililitrus apvienotā rezerves šķīduma (II) un 2. tabulā norādītos daudzumus no katra makrobarības rezerves šķīduma iemaisa 1 litrā dejonizēta ūdens, lai sagatavotu M7 barotni. Vitamīnu rezerves šķīdumu sagatavo, pievienojot 3 vitamīnus dejonizētam ūdenim, kā norādīts 3. tabulā, un neilgi pirms izmantošanas galīgajai M7 barotnei pievieno 0,1 ml apvienotā vitamīnu rezerves šķīduma. (Vitamīnu rezerves šķīdumu glabā sasaldētu mazos alikvotos.) Barotnei nodrošina aerāciju un to stabilizē.

LITERATŪRA

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.

1. tabula**Barotnes M4 un M7 mikroelementu rezerves šķīdumi**

Rezerves šķīdumi (I)	Daudzums (mg), ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens	Lai sagatavotu apvienoto rezerves šķīdumu (II), samaisa turpmāk norādītos rezerves šķīdumu (I) tilpumus (ml) un pievieno 1 litram dejonizēta ūdens		Galīgās koncentrācijas testa šķīdumos (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
RbCl ⁽¹⁾	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl_2	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ^{(1) (2)}	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ^{(1) (2)}	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Šīs vielas atšķiras M4 barotnē un M7 barotnē, kā norādīts iepriekš.

⁽²⁾ Šos šķīdumus sagatavo atsevišķi un pēc tam salej kopā un nekavējoties liek autoklāvā.

2. tabula

Makrobarības rezerves šķīdumi barotnei M4 un M7

	Daudzums, ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens (mg)	Makrobarības rezerves šķīdumu tilpums, ko pievieno, lai sagatavotu barotni M4 un M7 (ml/l)	Galīgās koncentrācijas testa šķīdumos M4 un M7 (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	293 800	1,0	293,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	246 600	0,5	123,3
KCl	58 000	0,1	5,8
NaHCO_3	64 800	1,0	64,8
$\text{NaSiO}_3 \cdot 9 \text{H}_2\text{O}$	50 000	0,2	10,0
NaNO_3	2 740	0,1	0,274
KH_2PO_4	1 430	0,1	0,143
K_2HPO_4	1 840	0,1	0,184

3. tabula

Vitamīnu rezerves šķīdums barotnei M4 un M7. Visus trīs vitamīnu šķīdumus apvieno, lai sagatavotu vienu vitamīnu rezerves šķīdumu

	Daudzums, ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens (mg)	Vitamīnu rezerves šķīduma tilpums, ko pievieno, lai sagatavotu barotni M4 un M7 (ml/l)	Galīgās koncentrācijas testa šķīdumos M4 un M7 (mg/l)
Tiamīna hidrohlorīds	750	0,1	0,075
Ciānkobalamīns (B12)	10	0,1	0,0010
Biotīns	7,5	0,1	0,00075

LITERATŪRA

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.

3. papildinājums

IZSTRĀDĀTU NOSĒDUMU SAGATAVOŠANA

Nosēdumu sastāvs

Izstrādāto nosēdumu sastāvam jābūt šādam:

Sastāvdaļa	Raksturlielumi	% no nosēdumu saussvara
Kūdra	Sfagnu sūnu kūdra, kuras pH ir pēc iespējas tuvāk 5,5–6,0 vērtībai, bez redzamām augu atliekām, smalki samalta (daļiņu izmērs: ≤ 1 mm) un izžāvēta ar gaisu	4–5
Kvarca smiltis	Smilšu graudu izmērs: > 50 % daļiņu jābūt 50–200 μm diapazonā	75–76
Kaolīna māli	Kaolīnīta saturs: ≥ 30 %	20
Organiskais ogleklis	Koriģē, pievienojot kūdras un smiltis	2 ($\pm 0,5$)
Kalcija karbonāts	CaCO_3 , pulverizēts, ķīmiski tīrs	0,05–0,1
Ūdens	Vadītspēja: ≤ 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$	30–50

Sagatavošana

Kūdras izžāvē gaisā un samal smalkā pulverī. Vajadzīgā daudzuma kūdras pulvera suspensiju dejonizētā ūdenī sagatavo, izmantojot efektīvu homogenizēšanas ierīci. Šīs suspensijas pH koriģē ar CaCO_3 līdz $5,5 \pm 0,5$ vērtībai. Suspensiju kondicionē vismaz divas dienas, viegli maisot 20 ± 2 °C temperatūrā, lai stabilizētu pH un izveidotu stabilu mikrobu sastāvdaļu. Vēlreiz mēra pH, kam jābūt $6,0 \pm 0,5$. Pēc tam kūdras suspensiju samaisa ar citām sastāvdaļām (smiltīm un kaolīna māliem) un dejonizētu ūdeni, lai iegūtu homogēnus nosēdumus ar ūdens saturu 30–50 % diapazonā no nosēdumu sausā svara. Vēlreiz mēra galīgā maisījuma pH un to koriģē 6,5–7,5 vērtībā ar CaCO_3 , ja vajadzīgs. Ņem nosēdumu paraugus, lai noteiktu saussvaru un organiskā oglekļa saturu. Pēc tam, pirms izstrādāto nosēdumu izmanto hironomīdu toksicitātes testēšanā, ir ieteicams tos kondicionēt septiņas dienas tādos pašos apstākļos, kādi būs testā.

Glabāšana

Mākslīgo nosēdumu sausās sastāvdaļas var arī uzglabāt sausā un vēsā vietā istabas temperatūrā. Izstrādātos (mitros) nosēdumus nedrīkstētu uzglabāt pirms to izmantošanas testā. Tie ir jāizmanto tūlīt pēc septiņu dienu kondicionēšanas perioda, kas pabeidz to sagatavošanu.

LITERATŪRA

Šā pielikuma C.8. nodaļa "Toksicitātes noteikšana sliekām".

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.

4. papildinājums

Atšķaidīšanai piemērota ūdens ķīmiskie raksturlielumi

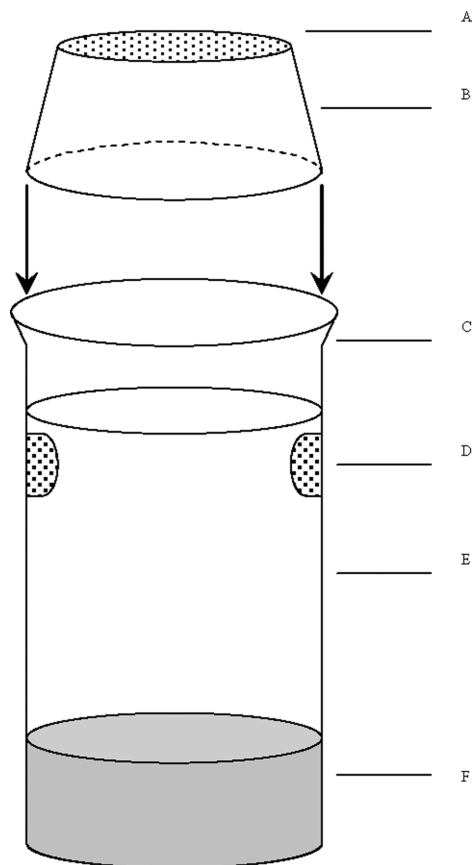
Vielā	Koncentrācijas
Daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 µg/l
Cietība kā CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Atlikumu hlors	< 10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	< 50 ng/l
Hlororganisko pesticīdu un polihlorbifenīlu kopējais saturs	< 50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	< 25 ng/l

(*) Tomēr jānorāda, ka, ja tiek prognozēta mijiedarbība starp cietības joniem un testējamo vielu, jāizmanto zemākas cietības ūdens (tādēļ šādā situācijā nedrīkst izmantot *Elendt* barotni M4).

5. papildinājums

Norādījumi par hironomīdu kāpuru šķīšanās uzraudzību

Uz testēšanas vārglāzēm izvieto izšķīšanās slazdus. Šie slazdi ir nepieciešami, sākot no 20. dienas līdz testēšanas beigām. Turpmāk ir attēlots izmantotā slazda paraugs.



A. Neilona aizsegs

D. Ūdens apmaiņas aizsega lūkas

B. Apgāzts plastmasas trauks

E. Ūdens

C. Bezlūpu ekspozīcijas vārglāze

F. Nosēdumi

C.28. TOKSICITĀTES TESTS AR NOSĒDUMU UN ŪDENS HIRONOMĪDIEM, IZMANTOJOT PIESĀTINĀTU ŪDENI

IEVADS

- Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (turpmāk – TG) 219 (2004. gads). Šī testēšanas metode ir izstrādāta ietekmes novērtēšanai, kuru izraisa ķīmisko vielu ilgstoša iedarbība uz nosēdumos dzīvojošiem saldūdens divspārņu kārtas kāpuriem *Chironomus* sp. Tās pamatā galvenokārt ir BBA norādījumi par nosēdumu un ūdens testēšanas sistēmas izmantošanu ar mākslīgu augsni un ūdens staba ekspozīcijas scenārijs (1). Tāpat ir ņemti vērā esošie toksicitātes testēšanas protokoli attiecībā uz *Chironomus riparius* un *Chironomus tentans*, kas ir izstrādāti Eiropā un Ziemeļamerikā (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) un kam veikta salīdzinošā izpēte (1) (6) (9). Var izmantot arī citas hironomīdu sugas, piemēram, *Chironomus yoshimatsui*, par ko pieejami detalizēti apraksti (10) (11).
- Šajā testēšanas metodē izmantotais ekspozīcijas scenārijs paredz ūdens piesātināšanu. Atbilstīgā ekspozīcijas scenārija izvēle ir atkarīga no paredzētā testēšanas lietojuma. Ūdens ekspozīcijas scenārija, kas ietver ūdens staba piesātināšanu, mērķis ir imitēt pesticīdu aerosolu pārvietošanās gadījumus, un šis scenārijs ietver sākuma maksimālās koncentrācijas porūdeni. Šis scenārijs var noderēt arī citiem ekspozīcijas veidiem (tostarp ķīmisko vielu noplūdēm), izņemot akumulācijas procesus, kas ilgst ilgāk nekā testēšanas periods.

3. Vienas, kas jātestē, lai noskaidrotu to iedarbību uz nosēdumos dzīvojošiem organismiem, parasti nosēdumos pastāv ilgstoši. Nosēdumos dzīvojošie organismi var tikt pakļauti iedarbībai dažādos veidos. Katra ekspozīcijas veida relatīvā nozīme un laiks, kas pāiet, lai rastos vispārēja toksiska iedarbība, ir atkarīgs no attiecīgās ķīmiskās vielas fizikālajām un ķīmiskajām īpašībām. Tādu vielu gadījumā, kam ir spēcīga adsorbēšanās spēja (piemēram, ar $\log K_{ow} > 5$) vai kas izveido homopolāru saiti ar nosēdumiem, būtisks ekspozīcijas veids var būt piesārņotas barības uzņemšana. Lai nodrošinātu, ka izteikti lipofilu vielu toksicitāte tiek novērtēta pietiekami precīzi, var apsvērt nosēdumiem pievienotās barības izmantošanu pirms testējamās ķīmiskās vielas pievienošanas. Lai ņemtu vērā visus iespējamās ekspozīcijas veidus, šī testēšanas metode koncentrējas uz ilgtermiņa ekspozīciju. Tests ilgst 20–28 dienas *C. riparius* un *C. yoshimatsui* sugām un 28–65 dienas *C. tentans* sugai. Ja īpašiem nolūkiem ir vajadzīgi īstermiņa dati, piemēram, lai izpētītu nestabilu ķīmisko vielu ietekmi, pēc 10 dienām var pārtraukt papildu atkārtojumus.
4. Mērītie mērķparametri ir izšķīlušos pieaugušo īpatņu kopējais skaits un izšķīšanās laiks. Ir ieteicams kāpuru izdzīvošanas un augšanas mērījumus veikt tikai pēc 10 dienām, ja ir vajadzīgi papildu īstermiņa dati, pēc vajadzības izmantojot papildu atkārtojumus.
5. Ieteicams izmantot izstrādātus nosēdumus. Izstrādātiem nosēdumiem ir vairākas priekšrocības salīdzinājumā ar dabīgiem nosēdumiem:
 - tiek samazināta eksperimentālā mainība, jo šādi nosēdumi izveido atkārtojamo “standartizētu matricu” un nav nepieciešams atrast nepiesārņotus un tīrus nosēdumu avotus,
 - testēšanu var sākt jebkurā laikā, nesaskaroties ar sezonālu mainību testēšanas nosēdumos, un nav nepieciešams nosēdumus iepriekš apstrādāt, lai tos attīrītu no vietējās faunas, turklāt izstrādātu nosēdumu izmantošana samazina izmaksas, kas saistītas ar pietiekamu nosēdumu daudzumu savākšanu dabā regulāras testēšanas vajadzībām,
 - izstrādātu nosēdumu izmantošana ļauj salīdzināt toksicitāti un attiecīgi klasificēt vielas; toksicitātes dati, ko ieguva testēšanā ar dabīgiem un mākslīgiem nosēdumiem, bija salīdzināmi vairākām ķīmiskajām vielām (2).
6. Definīcijas dotas 1. papildinājumā.

TESTĒŠANAS PRINCIPS

7. Vispirms hironomīdu kāpurus jebkurā attīstības stadijā pakļauj testējamās vielas koncentrāciju diapazona iedarbībai nosēdumu un ūdens sistēmās. Testēšanas sākumā pirmās attīstības stadijas kāpurus ievieto testēšanas vārglāzēs, kurās ir nosēdumu un ūdens sistēma, un pēc tam ūdeni piesātina ar testējamo vielu. Hironomīdu izšķīlšanos un attīstības ātrumu mēra testēšanas beigās. Kāpuru izdzīvošanu un svaru var noteikt jau pēc 10 dienām, ja vajadzīgs (izmantojot papildu atkārtojumus pēc vajadzības). Šos datus analizē, vai nu izmantojot regresijas modeļus, lai aplēstu koncentrāciju, kas izraisītu $\times$ % samazinājumu attiecībā uz izšķīlšanos, kāpuru izdzīvošanu vai augšanu (piemēram, EC_{15} , EC_{50} utt.), vai izmantojot statistiskās hipotēzes testēšanu, lai noteiktu NOEC/LOEC. Statistiskās hipotēzes testēšanā ir nepieciešams salīdzināt ietekmes vērtības ar kontroles vērtībām, izmantojot statistiskus testus.

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO VIELU

8. Ir jābūt zināmai testējamās ķīmiskās vielas šķīdībai ūdenī, tās tvaika spiedienam, izmērītajai vai aprēķinātajai daļai nosēdumos un stabilitātei ūdenī un nosēdumos. Jābūt pieejamai uzticamai analītiskajai metodei, ar ko būtu iespējams kvantificēt testējamo ķīmisko vielu ūdens virsējā slānī, porūdenī un nosēdumos ar zināmu un apstiprinātu precizitāti un noteikšanas ierobežojumu. Lietderīga informācija ietver testējamās ķīmiskās vielas struktūrformulu un tīrību. Tāpat lietderīgi ir zināt testējamās vielas ķīmisko sadalīšanos (piemēram, izkliedēšanās, abiotiskā un biotiskā noārdīšanās utt.). Papildu norādījumi par tādu vielu testēšanu, kuras ir sarežģīti testēt to fizikālo un ķīmisko īpašību dēļ, pieejami atsaucē (12).

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

9. Periodiski var testēt ķīmiskās standartvielas, lai pārbaudītos, ka testēšanas protokols un apstākļi ir uzticami. Toksisko standartvielu, kas sekmīgi izmantotas salīdzinošajā testēšanā un validēšanas pētījumos, piemēri ietver lindānu, trifluralīnu, pentahlorfenolu, kadmija hlorīdu un kālija hlorīdu (1) (2) (5) (6) (13).

TESTA DERĪGUMS

10. Lai tests būtu derīgs, piemēro šādus nosacījumus:

— izšķīšanās apmēram kontroles traukos jābūt vismaz 70 % testēšanas beigās (1) (6),

- *C. riparius* un *C. yoshimatsui* izšķīšanās līdz pieaugušiem īpatņiem no kontroles traukiem jānotiek 12–23 dienu laikā pēc to ievietošanas traukos; *C. tentans* ir vajadzīgas 20–65 dienas,
- testēšanas beigās katrā traukā jānosaka pH un izšķīdušā skābekļa koncentrācija; skābekļa koncentrācijai jābūt vismaz 60 % no gaisa piesātinājuma vērtības (turpmāk – ASV) izmantotajā temperatūrā, savukārt pH ūdens virsējā slānī jābūt 6–9 diapazonā visos testēšanas traukos,
- ūdens temperatūra nedrīkstētu atšķirties vairāk kā par $\pm 1,0$ °C; ūdens temperatūru varētu kontrolēt ar izotermisku telpu, un tādā gadījumā temperatūra telpā ir jāapstiprina atbilstīgos laika intervālos.

METODES APRAKSTS

Testēšanas trauki

11. Pētījumu veic 600 ml stikla vārglāzēs ar 8 cm diametru. Der arī citi trauki, bet tiem jānodrošina piemērots ūdens virsējā slāņa un nosēdumu dziļums. Nosēdumu virsmai jābūt pietiekamai, lai nodrošinātu 2–3 cm² telpu katram kāpuram. Nosēdumu slāņa dziļuma attiecībai pret ūdens virsējā slāņa dziļumu jābūt 1:4. Testēšanas traukiem un citām iekārtām, kas saskarsies ar testēšanas sistēmu, jābūt pilnībā izgatavotām no stikla vai cita ķīmiski inerta materiāla (piemēram, teflona).

Sugu izvēle

12. Testēšanā vēlams izmantot *Chironomus riparius* sugas. Arī *Chironomus tentans* ir piemēroti, bet grūtāk apstrādājami, un tiem vajadzīgs ilgāks testēšanas periods. Var izmantot arī *Chironomus yohimatsui*. Sīka informācija par kultūru metodēm attiecībā uz *Chironomus riparius* ir sniegta 2. papildinājumā. Informācija par kultūras apstākļiem ir pieejama arī attiecībā uz citām sugām, t. i., *Chironomus tentans* (4) un *Chironomus yoshimatsui* (11). Sugu noteikšana ir jāapstiprina pirms testēšanas, bet nav vajadzīga pirms katras testēšanas reizes, ja organismi ir iegūti no laboratorijā kultivētas kultūras.

Nosēdumi

13. Vēlams izmantot izstrādātus nosēdumus (saukti arī par rekonstituētajiem, mākslīgajiem vai sintētiskajiem nosēdumiem). Tomēr, ja izmanto dabīgos nosēdumus, tie ir jāraksturo (vismaz pH, organiskā oglekļa sastāvs, ieteicama arī tādu citu parametru noteikšana kā C/N attiecība un granulometrija) un tajos nedrīkstētu būt nekāds piesārņojums un citi organismi, kas varētu konkurēt ar hironomīdiem vai baroties ar tiem. Ieteicams arī pirms izmantošanas hironomīdu toksicitātes testēšanā dabīgos nosēdumus kondicionēt septiņas dienas tādos pašos apstākļos, kādi pastāvēs testēšanā. Šajā testā (1) (15) (16) ir ieteicams izmantot šādus izstrādātus nosēdumus, par pamatu izmantojot mākslīgu augsni, ko izmanto C.8. testēšanas metodē (14):
 - a) 4–5 % (saussvars) kūdras – pēc iespējas pietuvināta pH 5,5–6,0 apmērā; ir svarīgi izmantot pulverizētu kūdru, kas smalki samalta (daļiņu izmērs ≤ 1 mm) un kas ir izžāvēta vienīgi ar gaisu;
 - b) 20 % (saussvars) kaolīna mālu (kaolīnīta saturam vēlams būt virs 30 %);
 - c) 75–76 % (saussvars) kvarca smilšu (pārsvārā tām jāsatīva no smalkām smiltīm, proti, vairāk nekā 50 % daļiņu jābūt 50–200 μ m izmērā);
 - d) pievieno dejonizētu ūdeni, lai iegūtu galīgā maisījuma mitrumu 30–50 % diapazonā;
 - e) pievieno ķīmiski tīras kvalitātes kalcija karbonātu (CaCO₃), lai koriģētu galīgā nosēdumu maisījuma pH $7,0 \pm 0,5$ apmērā;
 - f) galīgā maisījuma organiskā oglekļa saturam jābūt 2 % ($\pm 0,5$), un tas jākorģē, izmantojot atbilstīgus daudzumus kūdras un smilšu saskaņā ar a) un c) apakšpunktu.
14. Jābūt zināmam kūdras, kaolīna mālu un smilšu avotam. Nosēdumu sastāvdaļas ir jāpārbauda, lai pārliecinātos, ka tajās nav ķīmiska piesārņojuma (piemēram, smago metālu, hlororganisko savienojumu, fosfororganisko savienojumu utt.). Izstrādātu nosēdumu sagatavošanas piemērs ir aprakstīts 3. papildinājumā. Ir pieņemami samaisīt arī sausas sastāvdaļas, ja tiek pierādīts, ka pēc ūdens virsējā slāņa pievienošanas nenotiek nosēdumu sastāvdaļu atdalīšanās (piemēram, kūdras daļiņu peldēšana pa ūdens virsmu) un ka kūdra vai nosēdumi ir pietiekami kondicionēti.

Ūdens

15. Jebkurš ūdens, kas atbilst 2. un 4. papildinājumā noteiktajiem pieņemama atšķaidīšanas ūdens ķīmiskajiem raksturlielumiem, ir piemērots kā testēšanas ūdens. Jebkads piemērots ūdens, proti, dabīgs ūdens (virszemes vai gruntsūdens), rekonstituēts ūdens (sk. 2. papildinājumu) vai krāna ūdens, no kura attīrīts hlors, ir izmantojams kā kultūras turēšanas un testēšanas ūdens, ja hironomīdi tajā bez stresa pazīmēm izdzīvo kultivēšanas un testēšanas laikā. Testēšanas sākumā testēšanas ūdens pH jābūt 6–9 diapazonā, savukārt kopējā cietība nedrīkst pārsniegt 400 mg/l kā CaCO_3 . Tomēr, ja tiek prognozēta mijiedarbība starp cietības joniem un testējamo vielu, jāizmanto zemākas cietības ūdens (tādēļ šādā situācijā nedrīkst izmantot *Elendt* barotni M4). Visa pētījuma laikā jāizmanto viena veida ūdens. Ūdens kvalitātes raksturlielumi, kas uzskaitīti 4. papildinājumā, jānosaka vismaz divreiz gadā vai tad, kad ir aizdomas, ka šie raksturlielumi varētu būt būtiski izmainījušies.

Rezerves šķīdumi – piesātināts ūdens

16. Testēšanas koncentrācijas aprēķina, pamatojoties uz koncentrācijām ūdens stabā, t. i., ūdens virsējā slānī virs nosēdumiem. Izraudzīto koncentrāciju testēšanas šķīdumus parasti gatavo, atšķaidot rezerves šķīdumu. Rezerves šķīdumus vēlams pagatavot, izšķīdinot testējamo vielu testēšanas barotnē. Lai iegūtu piemērotas koncentrācijas rezerves šķīdumu, dažos gadījumos var nākties izmantot šķīdinātājus vai dispersantus. Piemērotu šķīdinātāju piemēri ir acetons, etilspirts, metilspirts, etilēnglikola monoetilēteris, etilēnglikola dimetilēteris, dimetilformamīds un trietilēnglikols. Dispersanti, ko var izmantot, ir *Cremophor* RH40, *Tween* 80, metilceluloze 0,01 % un HCO-40. Šķīdinātājas vielas koncentrācijai galīgajā testēšanas barotnē jābūt minimālai (t. i., $\leq 0,1$ ml/l) un vienādai visās apstrādēs. Ja tiek izmantota šķīdinātāja viela, tai nedrīkst būt ievērojama ietekme uz izdzīvošanu vai redzama negatīva ietekme uz hironomīdu kāpuriem, ko var atklāt, pateicoties kontroles traukiem, kuri saņem tikai šķīdumu. Jebkurā gadījumā ir jācenšas izvairīties no šādu materiālu izmantošanas.

TESTĒŠANAS PLĀNS

17. Testēšanas plāns attiecas uz testēšanas koncentrāciju skaita un intervālu izvēli, trauku skaitu katram koncentrācijas līmenim un kāpuru skaitu traukā. Ir aprakstīti plāni ietekmes koncentrāciju (turpmāk – EC) punktu noteikšanai, NOEC noteikšanai un pieļaujamā daudzuma testa veikšanai. Regresijas analīze ir ieteicamāka nekā hipotēzes testēšanas pieeja.

Regresijas analīzes plāns

18. Testēšanā izmantotajām koncentrācijām ir jāaptver ietekmes koncentrācija (piemēram, EC_{15} , EC_{50}) un koncentrāciju diapazons, kurā ir jānoskaidro testējamās vielas ietekme. Tas, ka ietekmes koncentrācija ir testēšanā izmantoto koncentrāciju diapazonā, parasti uzlabo ietekmes koncentrāciju (EC_x) noteikšanas precizitāti un it sevišķi derīgumu. Jāizvairās no ekstrapolācijas krietni zem zemākās pozitīvās koncentrācijas vai virs augstākās koncentrācijas. Ir lietderīgi veikt orientējošu diapazona noteikšanas testēšanu, lai izvēlētos izmantojamo koncentrāciju diapazonu (sk. 27. punktu).
19. Ja ir jānosaka EC_x , jātestē vismaz piecas koncentrācijas un trīs atkārtojumi katrai koncentrācijai. Jebkurā gadījumā ieteicams izmantot pietiekamu daudzumu testēšanas koncentrāciju, lai nodrošinātu modeli pamatotām aplēsēm. Koeficients starp koncentrācijām nedrīkstētu pārsniegt 2 (izņēmums varētu būt gadījumi, kad devu un atbildes reakcijas līknei ir sekls slīpums). Katras apstrādes atkārtojumu skaitu var samazināt, ja palielina testēšanas koncentrāciju skaitu ar dažādām atbildes reakcijām. Atkārtojumu skaita palielināšana vai testēšanas koncentrāciju intervālu samazināšana parasti noved pie šaurākiem testēšanas ticamības intervāliem. Ir vajadzīgi papildu atkārtojumi, ja kāpuru izdzīvošanu un augšanu nosaka jau pēc 10 dienām.

NOEC/LOEC noteikšanas plāns

20. Ja ir jānosaka LOEC/NOEC, jāizmanto piecas testēšanas koncentrācijas ar vismaz četriem atkārtojumiem un koeficients starp koncentrācijām nedrīkstētu pārsniegt 2. Atkārtojumu skaitam jābūt pietiekamam, lai nodrošinātu pietiekamu statistisko nozīmību un varētu konstatēt 20 % atšķirību no kontroles traukiem pie 5 % nozīmības līmeņa ($p = 0,05$). Attiecībā uz attīstības ātrumu parasti ir piemēroti veikt dispersijas analīzi (turpmāk – ANOVA), piemēram, *Dunnnett* testu vai *Williams* testu (17) (18) (19) (20). Attiecībā uz izšķīlšanās koeficientu var izmantot *Cochran-Armitage*, *Fisher* pieeju (ar *Bonferroni* korekciju) vai *Mantel-Haenszel* testu.

Pieļaujamā daudzuma testēšana

21. Pieļaujamā daudzuma testēšanu (vienu testēšanas koncentrāciju un kontroles trauks) var veikt, ja orientējošā diapazona noteikšanas testā netika konstatēta ietekme. Pieļaujamā daudzuma testēšanas mērķis ir norādīt, ka testējamās vielas toksiskā vērtība ir lielāka par testēto robežkoncentrāciju. Šajā testēšanas metodē nav iespējams ierosināt ieteikto koncentrāciju, lēmums par to ir jāpieņem regulatoriem. Parasti ir vajadzīgi vismaz seši atkārtojumi gan apstrādei, gan kontrolei. Ir jāpanāk pietiekama statistiskā nozīmība, lai varētu noteikt 20 % atšķirību no kontroles trauka pie 5 % nozīmības līmeņa ($p = 0,05$). Ar metrisku atbildes reakciju (attīstības ātrums un svars) t-testēšana parasti ir piemērota statistiskā metode, ja dati atbilst šā testa prasībām (normalitāte, homogēnas dispersijas). Var izmantot nevienlīdzīgas dispersijas t-testēšanu vai ar parametriem nesaistītu testu, piemēram, *Wilcoxon-Mann-Whitney* testu, ja nav atbilstības iepriekš norādītajām prasībām. Attiecībā uz izšķīlšanās koeficientu ir piemērota *Fisher* pieeja.

PROCEDŪRA

Ekspozīcijas apstākļi*Piesātinātās ūdens un nosēdumu sistēmas sagatavošana*

22. Atbilstīgus daudzumus izstrādātu nosēdumu (sk. 3. papildinājuma 13. un 14. punktu) pievieno testēšanas traukā, lai izveidotu vismaz 1,5 cm dziļu slāni. Ūdeni pielej 6 cm biezā slānī (sk. 15. punktu). Nosēdumu slāņa dziļuma attiecība pret ūdens slāņa dziļumu nedrīkstētu pārsniegt 1:4, un nosēdumu slānis nedrīkstētu būt dziļāks par 3 cm. Nosēdumu un ūdens sistēmai jānodrošina lēna aerācija septiņas dienas, pirms tiek ielaisti testēšanas organismi (sk. 14. punktu un 3. papildinājumu). Lai izvairītos no nosēdumu sastāvdaļu atdalīšanās un mazu daļiņu atkārtotas suspensijas ūdens stabā testēšanas ūdens pievienošanas laikā, nosēdumus var pārklāt ar plāsmas ripu ūdens uzliešanas laikā, bet pēc tam ripu nekavējoties noņemt. Šim nolūkam der arī citas ierīces.
23. Testēšanas trauki ir jāapsedz (piemēram, ar stikla plāksnēm). Ja vajadzīgs, pētījuma laikā ūdens līmeņus papildina līdz sākotnējam tilpumam, lai kompensētu ūdens iztvaikošanu. Tam jāizmanto destilēts vai dejonizēts ūdens, lai novērstu sāļu uzkrāšanos.

Testēšanas organismu pievienošana

24. Četras līdz piecas dienas pirms testēšanas organismu pievienošanas testēšanas traukos no kultūrām jāizņem oliņas un tās jāievieto nelielos traukos ar audzēšanas barotni. Var izmantot noturētu barotni no rezerves kultūras vai svaigi sagatavotu barotni. Ja izmanto svaigi sagatavotu barotni, kultūras barotnei jāpievieno neliels daudzums barības, piemēram, zaļalģes un/vai daži pilieni filtrāta no smalki samaltas zivju barības pārslu suspensijas (sk. 2. papildinājumu). Jāizmanto tikai svaigi izdētas oliņas. Parasti kāpuri sāk šķīties dažas dienas pēc oliņu izdēšanas (2–3 dienas *Chironomus riparius* 20 °C un 3–4 dienas *Chironomus tentans* 23 °C un *Chironomus yoshimatsu* 25 °C), un kāpuru augšana notiek četrās attīstības stadijās, no kurām katra ilgst 4–8 dienas. Testēšanā jāizmanto pirmās attīstības stadijas kāpuri (2–3 vai 1–4 dienas pēc izšķīšanās). Knišu attīstības stadiju var pārbaudīt, izmantojot galvas kapsulas platumu (6).
25. Katrā testēšanas traukā ar piesātinātiem nosēdumiem un ūdeni pēc nejaušības principa ievieto 20 pirmās attīstības stadijas kāpurus, izmantojot neasu pipeti. Kāpuru ievietošanas laikā testēšanas traukos ir jāpārtrauc ūdens aerācija, un šis pārtraukums jāturpina vēl 24 stundas pēc kāpuru ielaišanas (sk. 24. un 32. punktu). Saskaņā ar izmantoto testēšanas plānu (sk. 19. un 20. punktu) izmantoto kāpuru skaits uz katru koncentrāciju ir vismaz 60, lai noteiktu EC punktus, un 80, lai noteiktu NOEC.
26. Kad ir pagājušas 24 stundas kopš kāpuru ielaišanas, ūdens virsējo slāni piesātina ar testējamo vielu un atsāk lēnu aerāciju. Nelielus testējamās vielas šķīdumu tilpumus pievieno zem ūdens virsmas, izmantojot pipeti. Pēc tam ūdens virsējais slānis ir uzmanīgi jāsamaisa, neizkustinot nosēdumus.

Testēšanas koncentrācijas

27. Diapazona noteikšanas tests varētu būt lietderīgs, lai noteiktu koncentrāciju diapazonu galīgajam testam. Šim nolūkam izmanto virkni atšķirīgu testējamās vielas koncentrāciju. Lai hironomīdiem nodrošinātu tādu pašu virsmas blīvumu, kādu izmantos galīgajā testēšanā, hironomīdus pakļauj katras testējamās vielas koncentrācijas iedarbībai uz tādu laiku, kas ļauj aplēst aptuvenās testēšanas koncentrācijas. Atkārtojumi nav vajadzīgi.
28. Lēmumu par testēšanas koncentrācijām galīgajam testam pieņem, pamatojoties uz diapazona noteikšanas testa rezultātiem. Jāizmanto un saskaņā ar 18.–20. punktu jāizvēlas vismaz piecas koncentrācijas.

Kontroles trauki

29. Testēšanā ir jāietver kontroles trauki, kuros nav testējamās vielas, bet ir nosēdumi un kuriem nodrošina atbilstīgu skaitu atkārtojumu (sk. 19. un 20. punktu). Ja testējamās vielas pievienošanai ir izmantots šķīdums (sk. 16. punktu), jāizmanto arī nosēdumu šķīduma kontroles trauks.

Testēšanas sistēma

30. Izmanto statiskas sistēmas. Izņēmuma gadījumos, piemēram, ja ūdens kvalitātes specifikācijas nav piemērotas testēšanas organismam vai ietekmē ķīmisko līdzsvaru (piemēram, izšķīdušā skābekļa līmeni pārmērīgi pazeminās, izvadproduktu koncentrācija pārmēru paaugstinās vai no nosēdumiem ekstrahējas minerāli un ietekmē pH un/vai ūdens cietību), var izmantot daļēji statiskas vai caurplūdes sistēmas ar ūdens virsējā slāņa periodisku vai nepārtrauktu atjaunošanu. Tomēr parasti derēs un ir ieteicamas citas ūdens virsējā slāņa kvalitātes uzlabošanas metodes, piemēram, aerācija.

Barība

31. Kāpuri ir jābaro, vēlams, katru dienu vai vismaz trīs reizes nedēļā. Katram jaunam kāpuram pirmās 10 dienas pietiek ar zivju barību (suspensija ūdenī vai smalki samalta barība, piemēram, *TetraMin* vai *TetraPhyll*, sk. 2. papildinājumu) 0,25–0,5 mg apmērā (0,35–0,5 mg *C. yoshimatsui*). Nedaudz vairāk barības varētu vajadzēt vecākiem kāpuriem, proti, 0,5–1 mg uz kāpuru dienā, ar ko vajadzētu pietikt līdz testēšanas beigām. Ja tiek novērota sēnīšu augšana vai ja kontroles traukos ir novērota mirstība, barības porcija ir jāsamazina visos traukos un jākontrolē. Ja sēnīšu attīstību neizdodas apturēt, testēšana ir jāatkārto. Ja tiek testētas vielas, kam ir spēcīga adsorbēšanās spēja (piemēram, ar $\log K_{ow} > 5$) vai kas izveido homopolāru saitī ar nosēdumiem, barības daudzumu, kurš vajadzīgs organismu izdzīvošanas un dabīgas augšanas nodrošināšanai, var pievienot izstrādātajiem nosēdumiem pirms stabilizācijas perioda. Šādam nolūkam jāizmanto augu materiāls, nevis zivju barība, proti, var pievienot 0,5 % (saussvars) smalki samaltas lapas, piemēram, nātres (*Urtica dioica*), zīdkoka (*Morus alba*), baltā āboliņa (*Trifolium repens*) vai spinātu (*Spinacia oleracea*) lapas, vai citu augu materiālu (*Cerophyl* vai alfa-celulozi).

Inkubācijas apstākļi

32. Kad ir pagājušas, vēlams, 24 stundas pēc kāpuru ielaišanas, testēšanas traukos ūdens virsējām slānim nodrošina lēnu aerāciju, ko turpina visa testēšanas laikā (jāuzmanās, lai izšķīdušā skābekļa koncentrācija nepazeminās zem 60 % no ASV). Aerāciju nodrošina caur stikla Pastēra pipeti, kas piestiprināta 2–3 cm virs nosēdumu slāņa (t. i., vienu vai dažus burbuļus sekundē). Testējot gaistošas ķīmiskās vielas, var apsvērt iespēju nosēdumu un ūdens sistēmai aerāciju nenodrošināt.
33. Testēšanu veic nemainīgā 20 °C (± 2 °C) temperatūrā. *C. tentans* un *C. yoshimatsui* ieteicamā temperatūra ir attiecīgi 23 °C un 25 °C (± 2 °C). Piemēro 16 stundu apgaismojuma ilgumu, un gaismas intensitātei jābūt 500–1 000 luksiem.

Ekspozīcijas ilgums

34. Ekspozīcija sākas brīdī, kad kāpuri tiek ielaisti piesātinātajos un kontroles traukos. Maksimālais ekspozīcijas ilgums ir 28 dienas *C. riparius* un *C. yoshimatsui* un 65 dienas *C. tentans*. Ja kniži izšķīļas ātrāk, testēšanu var pārtraukt ne mazāk kā pēc piecām dienām pēc pēdējā pieaugušā īpatņa izšķīlšanās kontroles traukā.

NOVĒROJUMI

Izšķīlšanās

35. Nosaka pilnībā izšķīlušos knižu tēviņu un mātīšu attīstības laiku un kopējo skaitu. Tēviņus ir viegli atšķirt pēc to spalvainās antenas.
36. Testēšanas trauki ir jānovēro vismaz trīs reizes nedēļā, lai vizuāli novērtētu jebkādas anomālijas (piemēram, nosēdumu pamešana, neparasta peldēšana) salīdzinājumā ar kontroles traukiem. Paredzamās izšķīlšanās periodā katru dienu jāskaita izšķīlušies kniži. Katru dienu reģistrē pilnībā izšķīlušos knižu dzimumu un skaitu. Pēc identifikācijas knižus izņem no traukiem. Oliņas, kas izdētas pirms testa pabeigšanas, ir jāreģistrē un jāizņem, lai novērstu kāpuru atjaunošanos nosēdumos. Jāreģistrē arī redzamo kūniņu skaits, kuras nav izšķīlušās. Norādījumi par izšķīlšanās mērīšanu ir sniegti 5. papildinājumā.

Augšana un izdzīvošana

37. Ja ir jāsniedz dati par kāpuru izdzīvošanu un augšanu pēc 10 dienām, sākumā jāietver papildu testēšanas trauki, lai tos varētu izmantot šim nolūkam. Šo papildu trauku nosēdumus izkāš, izmantojot 250 μ m sietu, lai saglabātu kāpurus. Nāves kritēriji ir nekustīgums vai atbildes reakcijas trūkums uz mehānisku kairinājumu. Neatgūtie kāpuri arī jānoskaidro par mirušiem (kāpurus, kas nomiruši testēšanas sākumā, iespējams, ir noārdījuši mikrobi). Nosaka izdzīvojušo kāpuru sauso svaru (bez pelniem) katrā testēšanas traukā un aprēķina vidējo atsevišķo sausvaru katrā traukā. Ir lietderīgi noteikt, kurai attīstības stadijai pieder izdzīvojušais kāpurs. Šim nolūkam var izmantot katra īpatņa galvas kapsulas platuma mērījumu.

Analītiskie mērījumi

Testējamās vielas koncentrācija

38. Testēšanas sākumā (vēlāmāk tad, kad ir pagājusi viena stunda pēc testējamās vielas pievienošanas) un beigās analizē vismaz ūdens virsējā slāņa, porūdens un nosēdumu paraugus no augstākās un zemākās koncentrācijas. Šāda testējamās vielas koncentrācijas noteikšana sniedz informāciju par testējamās vielas attīstību/sadalīšanos ūdens un nosēdumu sistēmā. Nosēdumu paraugu ņemšana testēšanas sākumā var ietekmēt testēšanas sistēmu (piemēram, var tikt izņemti testēšanas kāpuri), tādējādi analītisku mērījumu vajadzībām testēšanas sākumā un

laikā jāizmanto papildu testēšanas trauki, ja tas ir atbilstīgi (sk. 39. punktu). Mērījumi nosēdumos var nebūt nepieciešami, ja testējamās vielas sadalīšanās starp ūdeni un nosēdumiem ir skaidri noteikta ūdens/nosēdumu pētījumā salīdzināmos apstākļos (piemēram, nosēdumu un ūdens attiecība, pievienošanas veids, organiskā oglekļa saturs nosēdumos).

39. Ja veic starpposma mērījumus (piemēram, septītajā dienā) un ja analīzei ir vajadzīgi lieli paraugi, ko nevar paņemt no testēšanas traukiem, neietekmējot testēšanas sistēmu, jāveic analītiska noteikšana no paraugiem, kuri ņemti no papildu testēšanas traukiem, kas saņēmuši tādu pašu apstrādi (ietverot testēšanas organismus), bet netiek izmantoti bioloģiskajiem novērojumiem.
40. Lai izolētu starpūdeni, ieteicama centrifugēšana, piemēram, 10 000 g 4 °C temperatūrā 30 minūtes. Tomēr, ja tiek pierādīts, ka testējamā viela neadsorbējas uz filtriem, var būt pieņemami izmantot arī filtrēšanu. Dažos gadījumos var būt neiespējami analizēt koncentrācijas porūdenī, jo parauga izmērs ir pārāk mazs.

Fizikālie un ķīmiskie parametri

41. Atbilstīgi ir jānosaka testēšanas ūdens pH un izšķīdušais skābeklis un testēšanas trauku temperatūra (sk. 10. punktu). Testēšanas sākumā un beigās jānosaka arī cietība un amonjaks kontroles traukos un vienā testēšanas traukā ar augstāko koncentrāciju.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

42. Šā testa mērķis ir noteikt testējamās vielas ietekmi uz attīstības ātrumu un pilnībā izšķīlušos kniņu tēviņu un mātīšu kopējo skaitu vai – 10 dienu testēšanas gadījumā – ietekmi uz kāpuru izdzīvošanu un svaru. Ja nav nekādu norāžu par statistiski atšķirīgu jutību atkarībā no dzimuma, tēviņu un mātīšu rezultātus var apvienot, lai veiktu statistisko analīzi. Jutības atšķirības starp dzimumiem var statistiski novērtēt, piemēram, ar $\chi^2 - r \times 2$ testu. Ja vajadzīgs, pēc 10 dienām ir jānosaka kāpuru izdzīvošana un vidējais atsevišķais saussvars katrā traukā.
43. Ietekmes koncentrācijas, kas izteiktas kā koncentrācijas ūdens virsējā slānī, vēlama aprēķināt, pamatojoties uz izmēritajām koncentrācijām testēšanas sākumā (sk. 38. punktu).
44. Lai aprēķinātu punktu aplēsi EC_{50} vai jebkurai citai EC_x , kā patiesus atkārtojumus var izmantot statistiku par situāciju pirms ievietošanas traukos. Aprēķinot ticamības intervālu jebkurai EC_x , jāņem vērā mainība starp traukiem vai ir jāpierāda, ka šī mainība ir tik maza, ka to var neņemt vērā. Ja modeli aprīko saskaņā ar mazāko kvadrātu metodi, statistika par situāciju pirms ievietošanas traukos ir jākorrigē, lai uzlabotu mainības homogenitāti. Tomēr EC_x vērtības ir jāaprēķina pēc tam, kad atbildes reakcija ir atkorigēta atpakaļ uz sākotnējo vērtību.
45. Ja statistiskās analīzes mērķis ir noteikt NOEC/LOEC ar hipotēzes testēšanu, jāņem vērā mainība starp traukiem, piemēram, ar ielīdzdotu ANOVA. Var arī izmantot stabilākus testus (21) situācijās, kad ir pārākpi parastie ANOVA pieņēmumi.

Izšķīlšanās koeficients

46. Izšķīlšanās koeficienti ir kvantitatīvi dati, ko var analizēt ar *Cochran-Armitage* testu, kuru īsteno pakāpeniski, ja ir paredzama monotona devas un atbildes reakcijas attiecība un ja šie dati atbilst šādai prognozei. Ja minētais tests analīzei neder, var izmantot *Fisher* pieeju vai *Mantel-Haenszel* testu ar *Bonferroni-Holm* koriģētajām p-vērtībām. Ja pastāv liecības par lielāku mainību starp atkārtojumiem ar vienu un to pašu koncentrāciju, nekā to norādītu binomināls sadalījums (nereti uz to atsaucas kā uz "papildu binominālu" mainību), tad jāizmanto stabils *Cochran-Armitage* vai *Fisher* pieejas tests, kā ierosināts atsaucē (21).

47. Nosaka katrā traukā izšķīlušos kniņu summu (n_e), ko dala ar ielaisto kāpuru skaitu (n_a):

$$ER = \frac{n_e}{n_a}$$

kur:

ER = izšķīlšanās koeficients;

n_e = katrā traukā izšķīlušos kniņu skaits;

n_a = katrā traukā ielaisto kāpuru skaits.

48. Lieliem paraugu apjomiem piemērota alternatīva, ja pastāv papildu binomināla mainība, ir iespēja izšķīlšanās koeficientu uzskatīt par nepārtrauktu atbildes reakciju un izmantot tādas procedūras kā *William tests*, ja ir paredzama monotona devas un atbildes reakcijas attiecība un ja tas atbilst šiem izšķīlšanās koeficienta datiem. *Dunnnett tests* būtu piemērots, ja monotonuma nav. Šajā kontekstā liels parauga apjoms tiek definēts kā gadījums, kad gan izšķīlušos īpatņu skaits, gan neizšķīlušos īpatņu skaits pārsniedz piecus katrā atkārtojumā (traukā).
49. Lai piemērotu ANOVA metodes, izšķīlšanās koeficienta vērtības ir vispirms jāpārvērš ar *arcsin* kvadrātsaknes transformāciju vai ar *Tukey-Freeman* transformāciju, lai iegūtu aptuveno normālo sadalījumu un izlīdzinātu mainības. Izmantojot absolūto periodiskumu, var piemērot *Cochran-Armitage*, *Fisher* pieejas (*Bonferroni*) vai *Mantel-Haenszel* testu. *Arcsin* kvadrātsaknes transformāciju piemēro, ņemot izšķīlšanās koeficienta kvadrātsaknes inverso sinusu ($\sin^{-1}$).
50. Izšķīlšanās koeficientiem EC_x vērtības aprēķina, izmantojot regresijas analīzi (vai, piemēram, *probit* (22), *logit*, *Weibull*, atbilstīgu tirdzniecībā pieejamu programmatūru utt.). Ja regresijas analīze ir nesekmīga (piemēram, tiek iegūtas mazāk nekā divas daļējas atbildes reakcijas), izmanto citas ar parametriem nesaistītas metodes, tādas kā slidošā vidējā vai vienkāršā interpolācija.

Attīstības ātrums

51. Vidējais attīstības laiks ir vidējais laikposms starp kāpuru ielaišanu (testa 0. diena) un testēšanas kniņu izšķīlšanos. (Lai aprēķinātu patieso attīstības laiku, jāapsver kāpuru vecums ielaišanas brīdī.) Attīstības ātrums ir attīstības laika apgriezta vērtība (vienība: 1/diena) un ir kāpuru vienas dienas attīstības daļa. Attīstības ātrums ir ieteicamāks, lai novērtētu šos nosēdumu toksicitātes pētījumus, jo tā mainība ir mazāka un tas ir homogēnāks un tuvāks normālam sadalījumam salīdzinājumā ar attīstības laiku. Tādējādi efektīvas parametru testēšanas procedūras var izmantot drīzāk ar attīstības ātrumu, nevis ar attīstības laiku. Attiecībā uz attīstības ātrumu kā nepārtrauktu atbildes reakciju EC_x vērtības var aplēst, izmantojot regresijas analīzi (piemēram, (23) (24)).
52. Turpmākajiem statistiskajiem testiem pieņem, ka pārbaudes dienā x novēroto kniņu skaits ir izšķīlies vidējā laika intervālā starp dienu x un dienu $x - 1$ (l = pārbaudes intervāla ilgums, parasti 1 diena). Katra trauka vidējo attīstības ātrumu ($\bar{x}$) aprēķina šādi:

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

kur:

$\bar{x}$: vidējais attīstības ātrums katrā traukā;

i : pārbaudes intervāla indekss;

m : pārbaudes intervālu maksimālais skaits;

f_i : pārbaudes intervālā i izšķīlušos kniņu skaits;

n_e : kopējais kniņu skaits, kas izšķīlušies eksperimenta beigās ($= \sum f_i$)

x_i : intervālā i izšķīlušos kniņu attīstības ātrums.

$$x_i = 1 / \left(\text{day}_i - \frac{l_i}{2} \right)$$

kur:

day_i : pārbaudes diena (dienas kopš ielaišanas);

l_i : pārbaudes intervāla i ilgums (dienas, parasti viena diena).

Testēšanas pārskats

53. Testēšanas pārskatā jāietver vismaz šāda informācija:

Testējamā viela:

- fizikālās īpašības un attiecīgā gadījumā fizikālās un ķīmiskās īpašības (šķīdība ūdenī, tvaika spiediens, sadalīšanās koeficients augsnē (vai nosēdumos, ja pieejams), stabilitāte ūdenī utt.),
- ķīmiskās identifikācijas dati (vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums, struktūrformula, CAS numurs utt.), ietverot tīrību un analītisko metodi, ar ko ir iespējams kvantificēt testējamo vielu.

Testēšanas sugas:

- izmantotie testēšanas dzīvnieki: suga, zinātniskais nosaukums, organismu avots un pavairošanas apstākļi,
- informācija par oliņu un kāpuru apstrādi,
- testēšanas dzīvnieku vecums ielaišanas brīdī testēšanas traukos.

Testēšanas apstākļi:

- izmantotie nosēdumi, t. i., dabīgi vai izstrādāti nosēdumi,
- dabīgajiem nosēdumiem – nosēdumu paraugu ņemšanas vietas atrašanās vieta un apraksts, ietverot, ja iespējams, piesārņojuma vēsturi; raksturlielumi – pH, organiskā oglekļa saturs, C/N attiecība un granulometrija (ja vajadzīgs),
- izstrādāto nosēdumu sagatavošana: sastāvdaļas un raksturlielumi (organiskā oglekļa saturs, pH, mitrums utt. testēšanas sākumā),
- testēšanas ūdens sagatavošana (ja izmanto rekonstituētu ūdeni) un raksturlielumi (skābekļa koncentrācija, pH, vadītspēja, cietība utt. testēšanas sākumā),
- nosēdumu un ūdens virsējā slāņa dziļums,
- ūdens virsējā slāņa un porūdens tilpums; mitru nosēdumu svars ar porūdeni un bez tā,
- testēšanas trauki (materiāls un izmērs),
- rezerves šķīdumu un testēšanas koncentrāciju sagatavošanas metode,
- testējamās vielas pievienošana: izmantotās testēšanas koncentrācijas, atkārtojumu skaits un šķīdums, ja tas izmantots,
- inkubācijas apstākļi: temperatūra, apgaismojuma cikls un intensitāte, aerācija (regularitāte un intensitāte),
- sīka informācija par barošanu, arī par barības veidu, sagatavošanu, daudzumu un barošanas režīmu.

Rezultāti:

- testēšanas nominālās koncentrācijas, izmērītās testēšanas koncentrācijas un visu analīžu rezultāti, lai noteiktu testējamās vielas koncentrāciju testēšanas traukā,
- ūdens kvalitāte testēšanas traukos, t. i., pH, temperatūra, izšķīdušais skābeklis, cietība un amonjaks,
- iztvaikojušā testēšanas ūdens aizvietošana, ja tā veikta,
- izšķīlušos kniņu tēviņu un mātīšu skaits katrā traukā un katru dienu,
- to kāpuru skaits katrā traukā, kas neizšķīlās par knišļiem,
- kāpuru vidējais atsevišķais saussvars katrā traukā un katrā attīstības stadijā, ja vajadzīgs,
- izšķīlšanās īpatsvars katrā atkārtojumā un testēšanas koncentrācijā (kniņu tēviņu un mātīšu datus apvieno),
- pilnībā izšķīlušos kniņu vidējais attīstības ātrums katrā atkārtojumā un apstrādes līmenī (kniņu tēviņu un mātīšu datus apvieno),
- toksisko mērķparametru aplēses, piemēram, EC_x (un saistītie ticamības intervāli), $NOEC$ un/vai $LOEC$, kā arī to noteikšanai izmantotās statistiskās metodes,
- rezultātu apspriešana, arī ietekme uz testēšanas rezultātiem, kuru rada atkāpes no šīs testēšanas metodes.

LITERATŪRA

- (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.
- (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 (*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) Ša pielikuma C.8. nodaļa "Toksicitātes noteikšana sliekām".
- (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. Statist. 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.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Šajā metodē ir izmantoti šādi termini:

Izstrādāti nosēdumi jeb rekonstituēti, mākslīgi vai sintētiski nosēdumi ir tādu materiālu maisījums, ko izmanto, lai imitētu dabīgu nosēdumu fizikālās sastāvdaļas.

Ūdens virsējais slānis ir ūdens, ar ko nosegti nosēdumi testēšanas traukā.

Starpūdens jeb porūdens ir ūdens, kas aizņem telpu starp nosēdumiem un augsnes daļiņām.

Piesātināts ūdens ir testēšanas ūdens, kam pievienota testējamā viela.

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

2. papildinājums

Ieteikumi attiecībā uz *Chironomus riparius* kultūru

1. *Chironomus* kāpurus var audzēt kristalizācijas traukos vai lielākās tvertnēs. Smalkas kvarca smiltis izklāj plānā, aptuveni 5–10 mm slānī tvertnes apakšā. Ir pierādīts arī, ka kā piemērotu substrātu var izmantot *Kieselguhr* (piemēram, Merck, 8117, pants) (pietiek ar plānāku slāni tikai dažu mm augstumā). Pēc tam pievieno piemērotu ūdeni, lai dziļums būtu vairāki cm. Ūdens līmenis ir jāpaaugstina pēc vajadzības, lai aizvietotu iztvaikoto daudzumu un novērstu izžūšanu. Ūdeni var apmainīt, ja vajadzīgs. Jānodrošina lēna aerācija. Kāpuru audzēšanas trauki jātur piemērotā būrī, kas nepieļaus izšķīlušos pieaugušo īpatņus izbēgšanu. Būrim jābūt pietiekami lielam, lai būtu iespējama izšķīlušos pieaugušo īpatņu spietošana, pretējā gadījumā nenotiks kopulācija (ne mazāks kā apm. 30 × 30 × 30 cm).
2. Būri jātur istabas temperatūrā vai nemainīgas vides telpā 20 ± 2 °C ar 16 stundu apgaismojuma periodu (intensitāte apm. 1 000 luks) un astoņu stundu tumsas periodu. Ir norādīts, ka gaisa mitrums zem 60 % RH var kavēt reprodukciju.

Ūdens atšķaidīšanai

3. Var izmantot jebkuru piemērotu dabīgu vai sintētisku ūdeni. Bieži izmanto akas ūdeni, krāna ūdeni, no kura attīrīts hlors, un mākslīgu līdzekli (piemēram, *Elendt M4* vai *M7* barotni, sk. turpmāk). Ūdenim pirms izmantošanas jānodrošina aerācija. Ja vajadzīgs, kultūras ūdeni var atjaunot, izmantoto ūdeni no kultivēšanas traukiem uzmanīgi nolejot vai sifonējot, nesadragājot kāpuru kūniņas.

Kāpuru barošana

4. *Chironomus* kāpuri ir jābaro ar zivju barības pārsļām (*TetraMin*®, *TetraPhyll*® vai citu līdzīga zīmola patentētu zivju barību), katrā traukā dienā ievietojot aptuveni 250 mg. Barību var dot kā sausu samaltu pulveri vai kā suspensiju ūdenī, proti, 1,0 g barības pārsļu pievieno 20 ml destilēta ūdens un samaisa, līdz iegūst homogēnu maisījumu. Šo sagatavi var izbarot aptuveni 5 ml apmērā katrā traukā katru dienu (pirms lietošanas sakratīt). Vecāki kāpuri var saņemt vairāk barības.
5. Barošanu pielāgo atbilstīgi ūdens kvalitātei. Ja kultivēšanas barotne kļūst duļķaina, barošana ir jāsamazina. Barības papildinājumi ir rūpīgi jāuzrauga. Pārāk maz barības izraisīs kāpuru emigrāciju vertikālā ūdens slāņa virzienā, savukārt pārāk daudz barības izraisīs mikrobu aktivitātes pieaugumu un samazinās skābekļa koncentrācijas. Abas situācijas var novest pie mazākiem augšanas ātrumiem.
6. Izveidojot jaunus kultivēšanas traukus, var pievienot dažas zaļalģu (piemēram, *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*) šūnas.

Izšķīlušos pieaugušo īpatņu barošana

7. Dažos testos ir iegūtas liecības, ka kokvilnas spilventiņš, kas piesūcināts ar piesātinātu saharozes šķīdumu, var nodrošināt barību izšķīlušiem pieaugušiem īpatņiem.

Izšķīlšanās

8. Divdesmit grādu ± 2 °C temperatūrā pieaugušie īpatņi sāks šķīsties no kāpuru audzēšanas traukiem aptuveni pēc 13–15 dienām. Tēviņus ir viegli atšķirt pēc to spalvainās antenas.

Oliņas

9. Tiklīdz vairošanas būrī ir pieaugušie īpatņi, visi kāpuru audzēšanas trauki ir jāpārbauda trīs reizes nedēļā, lai konstatētu izdētās želatīnveidīgās oliņas. Ja tās tiek atklātas, oliņas ir uzmanīgi jāizņem. Tās ir jāievieto nelielā šķīvī, kurā ir vairošanās ūdens paraugs. Oliņas izmanto, lai izveidotu jaunus kultivēšanas traukus (piemēram, 2–4 oliņu kopas katrā traukā), vai tās izmanto toksicitātes testēšanā.
10. Pirmās attīstības stadijas kāpuriem ir jāizšķīļas pēc 2–3 dienām.

Jaunu kultivēšanas trauku izveide

11. Pēc tam, kad ir izveidotas kultūras, katru nedēļu vai retāk var izveidot jaunu kāpuru kultivēšanas trauku atkarībā no testēšanas prasībām un vecos traukus izņemt no būriem pēc pieaugušo īpatņu izšķīlšanās. Ar šādu sistēmu var nodrošināt regulāru pieaugušo īpatņu piegādi ar minimāliem pārvaldības pasākumiem.

Testēšanas šķīdumu M4 un M7 sagatavošana

12. *Elendt* (1990. gads) ir aprakstījis M4 barotni. M7 barotni sagatavo tāpat kā M4 barotni, izņemot 1. tabulā norādītās vielas, kurām koncentrācijas M7 barotnē ir četras reizes mazākas nekā M4 barotnē. Pašlaik tiek gatavota publikācija par M7 barotni (*Elendt*, individuāls paziņojums). Testēšanas šķīdumu nevajadzētu sagatavot saskaņā ar *Elendt* un *Bias* (1990. gads), jo NaSiO_3 , $5 \text{ H}_2\text{O}$, NaNO_3 , KH_2PO_4 un K_2HPO_4 koncentrācijas, kas norādītas rezerves šķīdumu sagatavošanai, ir nepiemērotas.

M7 barotnes sagatavošana

13. Katru rezerves šķīdumu (I) sagatavo atsevišķi un apvienoto rezerves šķīdumu (II) pagatavo no šiem rezerves šķīdumiem (I) (sk. 1. tabulu). 50 mililitrus apvienotā rezerves šķīduma (II) un 2. tabulā norādītos daudzumus no katra makrobarības rezerves šķīduma iemaisa vienā litrā dejonizēta ūdens, lai sagatavotu M7 barotni. Vitamīnu rezerves šķīdumu sagatavo, pievienojot trīs vitamīnus dejonizētam ūdenim, kā norādīts 3. tabulā, un neilgi pirms izmantošanas galīgajai M7 barotnei pievieno 0,1 ml apvienotā vitamīnu rezerves šķīduma. (Vitamīnu rezerves šķīdumu glabā sasaldētu mazos alikvotos.) Barotnei nodrošina aerāciju un to stabilizē.

1. tabula

Barotnes M4 un M7 mikroelementu rezerves šķīdumi

Rezerves šķīdumi (I)	Daudzums (mg), ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens	Lai sagatavotu apvienoto rezerves šķīdumu (II), samaisa turpmāk norādītos rezerves šķīdumu (I) tilpumus (ml) un pievieno 1 litram dejonizēta ūdens		Galīgās koncentrācijas testēšanas šķīdumos (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
RbCl ⁽¹⁾	1 420	1,0	0,25	0,071	0,018
$\text{SrCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	3 040	1,0	0,25	0,152	0,038
NaBr ⁽¹⁾	320	1,0	0,25	0,016	0,004
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	1 260	1,0	0,25	0,063	0,016
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾	335	1,0	0,25	0,017	0,004
ZnCl_2	260	1,0	1,0	0,013	0,013
$\text{CaCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	200	1,0	1,0	0,010	0,010
KI	65	1,0	1,0	0,0033	0,0033
Na_2SeO_3	43,8	1,0	1,0	0,0022	0,0022
NH_4VO_3	11,5	1,0	1,0	0,00058	0,00058
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾ ⁽²⁾	5 000	20,0	5,0	2,5	0,625
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ ⁽¹⁾ ⁽²⁾	1 991	20,0	5,0	1,0	0,249

⁽¹⁾ Šīs vielas atšķiras M4 barotnē un M7 barotnē, kā norādīts iepriekš.

⁽²⁾ Šos šķīdumus sagatavo atsevišķi un pēc tam salej kopā, un nekavējoties liek autoklāvā.

2. tabula

Makrobarības rezerves šķīdumi barotnei M4 un M7

	Daudzums, ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens (mg)	Makrobarības rezerves šķīdumu tilpums, ko pievieno, lai sagatavotu barotni M4 un M7 (ml/l)	Galīgās koncentrācijas testēšanas šķīdumos M4 un M7 (mg/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	293 800	1,0	293,8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	246 600	0,5	123,3

	Daudzums, ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens (mg)	Makrobarības rezerves šķīdumu tilpums, ko pievieno, lai sagatavotu barotni M4 un M7 (ml/l)	Galīgās koncentrācijas testēšanas šķīdumos M4 un M7 (mg/l)
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

3. tabula

Vitamīnu rezerves šķīdums barotnei M4 un M7

Visus trīs vitamīnu šķīdumus apvieno, lai sagatavotu vienu vitamīnu rezerves šķīdumu.

	Daudzums, ko pievieno 1 litram dejonizēta ūdens (mg)	Vitamīnu rezerves šķīduma tilpums, ko pievieno, lai sagatavotu barotni M4 un M7 (ml/l)	Galīgās koncentrācijas testēšanas šķīdumos M4 un M7 (mg/l)
Tiamīna hidrohlorīds	750	0,1	0,075
Ciānokobalamīns (B12)	10	0,1	0,0010
Biotīns	7,5	0,1	0,00075

LITERATŪRA

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.

3. papildinājums

IZSTRĀDĀTU NOSĒDUMU SAGATAVOŠANA

Nosēdumu sastāvs

Izstrādāto nosēdumu sastāvam jābūt šādam:

Sastāvdaļa	Raksturlielumi	% no nosēdumu saussvara
Kūdra	Sfagnu sūnu kūdra, kuras pH ir pēc iespējas tuvāk 5,5–6,0 vērtībai, bez redzamām augu atliekām, smalki samalta (daļiņu izmērs: ≤ 1 mm) un izžāvēta ar gaisu	4–5
Kvarca smiltis	Smilšu graudu izmērs: > 50 % daļiņu jābūt 50–200 μ m diapazonā	75–76
Kaolīna māli	Kaolīnīta saturs: ≥ 30 %	20
Organiskais ogleklis	Koriģē, pievienojot kūdru un smiltis	2 ($\pm 0,5$)
Kalcija karbonāts	CaCO_3 , pulverizēts, ķīmiski tīrs	0,05-0,1
Ūdens	Vadītspēja: ≤ 10 $\mu\text{S/cm}$	30-50

Sagatavošana

Kūdras izžāvē gaisā un samal smalkā pulverī. Vajadzīgā daudzuma kūdras pulvera suspensiju dejonizētā ūdenī sagatavo, izmantojot efektīvu homogenizēšanas ierīci. Šīs suspensijas pH koriģē ar CaCO_3 līdz $5,5 \pm 0,5$ vērtībai. Suspensiju kondicionē vismaz divas dienas, viegli maisot 20 ± 2 °C temperatūrā, lai stabilizētu pH un izveidotu stabilu mikrobu sastāvdaļu. Vēlreiz mēra pH, kam jābūt $6,0 \pm 0,5$. Pēc tam kūdras suspensiju samaisa ar citām sastāvdaļām (smiltīm un kaolīna māliem) un dejonizētu ūdeni, lai iegūtu homogēnus nosēdumus ar ūdens saturu 30–50 % diapazonā no nosēdumu sausā svara. Vēlreiz mēra galīgā maisījuma pH un to koriģē 6,5–7,5 vērtībā ar CaCO_3 , ja vajadzīgs. Ņem nosēdumu paraugus, lai noteiktu saussvaru un organiskā oglekļa saturu. Pēc tam, pirms izstrādātos nosēdumus izmanto hironomīdu toksicitātes testēšanā, ir ieteicams tos kondicionēt septiņas dienas tādos pašos apstākļos, kādi būs testā.

Glabāšana

Mākslīgo nosēdumu sausās sastāvdaļas var arī uzglabāt sausā un vēsā vietā istabas temperatūrā. Izstrādātos (mitros) nosēdumus nedrīkstētu uzglabāt pirms to izmantošanas testā. Tie ir jāizmanto tūlīt pēc septiņu dienu kondicionēšanas perioda, kas pabeidz to sagatavošanu.

LITERATŪRA:

Šā pielikuma C.8. nodaļa "Toksicitātes noteikšana sliekām".

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.

4. papildinājums

Atšķaidīšanai piemērota ūdens ķīmiskie raksturlielumi

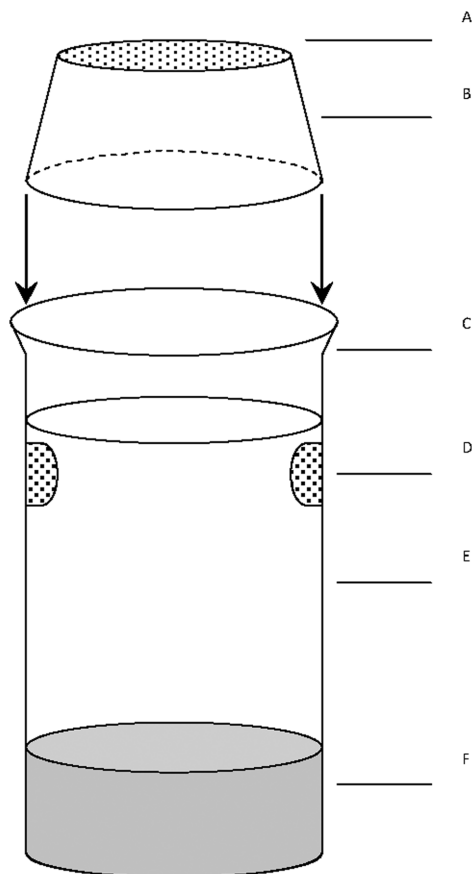
Vielā	Koncentrācijas
Daļiņas	< 20 mg/l
Kopējais organiskais ogleklis	< 2 mg/l
Nejonizēts amonjaks	< 1 µg/l
Cietība kā CaCO ₃	< 400 mg/l (*)
Atlikumu hlors	< 10 µg/l
Kopējie fosfororganiskie pesticīdi	< 50 ng/l
Hlororganisko pesticīdu un polihlorbifenīlu kopējais saturs	< 50 ng/l
Kopējais organiskais hlors	< 25 ng/l

(*) Tomēr jānorāda, ka, ja tiek prognozēta mijiedarbība starp cietības joniem un testējamo vielu, jāizmanto zemākas cietības ūdens (tādēļ šādā situācijā nedrīkst izmantot *Elendt* barotni M4).

5. papildinājums

Norādījumi par hironomīdu kāpuru šķīšanās uzraudzību

Uz testēšanas vārglāzēm izvieto izšķīšanās slazdus. Šie slazdi ir nepieciešami, sākot no 20. dienas līdz testēšanas beigām. Turpmāk ir attēlots izmantotā slazda paraugs.



A.: Neilona aizsegs

B.: Apgāzts plastmasas trauks

C.: Bezlūpu ekspozīcijas vārglāze

D.: Ūdens apmaiņas aizsega lūkas

E.: Ūdens

F.: Nosēdumi

C.29. VIEGLAS BIONOĀRDĪŠANĀS SPĒJA – CO₂ HERMĒTISKI NOSLĒGTOS TRAUKOS (BRĪVĀ TILPUMA TESTS)

IEVADS

1. Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (turpmāk – TG) 310 (2006. gads). Šī testēšanas metode ir skrīninga metode, ko izmanto, lai novērtētu ķīmisko vielu bionoārdīšanās spēju, un kas nodrošina līdzīgu informāciju, kādu var iegūt sešās testēšanas metodēs, kuras aprakstītas šā pielikuma C.4.-A–C.4.-F nodaļā. Tāpēc ķīmisku vielu, kas uzrāda pozitīvus rezultātus saskaņā ar šo testēšanas metodi, var uzskatīt par viegli bionoārdāmu un tālāk ātri noārdāmu vidē.
2. Parasti mazšķīstošu un spēcīgi adsorbējošu ķīmisko vielu testēšanai kā pirmo izvēlas iedibināto oglekļa dioksīda (CO₂) metodi (1), kuras pamatā ir *Sturm* sākotnējais tests (2), ar ko novērtē organisku ķīmisko vielu bionoārdīšanos, mērot oglekļa dioksīdu, kuru rada mikrobu darbība. To izvēlas arī šķīstošām (bet ne gaistošām) ķīmiskajām vielām, jo tiek plaši uzskatīts, ka oglekļa dioksīda veidošanās ir vienīgais neapšaubāmais mikrobu darbības pierādījums. Izšķīdušā organiskā oglekļa piesaisti var veicināt fizikālie un ķīmiskie procesi, proti, adsorbcija, izgaišana, nogulsnešanās, hidrolīze, kā arī mikrobu darbība, un daudzas nebioloģiskas reakcijas patērē skābekli. CO₂ no organiskām ķīmiskajām vielām reti kad veidojas abiotiski. Sākotnējā un modificētajā *Sturm* testā (1) (2) CO₂ tiek piesaistīts šķidrā fāzē un pārvietots uz adsorbējošajiem traukiem ar smidzināšanu

(t. i., gaisa burbuliņiem, kas apstrādāti tā, lai tie šķīdumā piesaistītu CO_2), savukārt saskaņā ar *Larson* pieeju (3) (4) CO_2 tiek pārvietots no reakcijas trauka uz absorbētājiem, cauri brīvajam tilpumam laižot gaisu bez CO_2 un papildus nepārtraukti kratot testēšanas trauku. Reakcijas trauku krata tikai saskaņā ar *Larson* modificēto pieeju. Maisīšana ir noteikta vienīgi nešķīstošām vielām ISO 9439 (5) un sākotnējā ASV redakcijā (6), un abos minētajos dokumentos ir norādīta smidzināšana, nevis brīvā tilpuma aizvietošana. Saskaņā ar citu oficiālu ASV EPA metodi (7), kuras pamatā ir *Gledhill* metode (8), kratīto reakcijas trauku noslēdz, nepieļaujot gaisa piekļuvi, un radušos CO_2 savāc iekšējā alkalīna uztvērējā tieši no gāzes fāzes tāpat kā klasiskajās *Warburg/Barcroft* respirometra kolbās.

3. Savukārt attiecībā uz neorganisku oglekli ir pierādīts, ka vairāku ķīmisko vielu gadījumā tas akumulējas barotnē, piemērojot standarta modificēto *Sturm* testu (9). Noārdoties 20 mg C/l anilīna, tika konstatēta neorganiskā oglekļa koncentrācija līdz 8 mg/l apmērā. Tādējādi CO_2 savākšana alkalīna uztvērējos nenodrošināja patiesu atspoguļojumu par kopējo CO_2 daudzumu, kas radies mikrobioloģiski visā noārdīšanās laikā. Rezultātā nosacījums, ka "10 dienu laikposmā" (10 dienas tūlīt pēc tam, kad ir sasniegta bionoārdīšanās 10 % apmērā) ir jāsavāc > 60 % no teorētiski radītā maksimālā CO_2 (turpmāk – ThCO_2), lai testējamo ķīmisko vielu varētu klasificēt kā viegli bionoārdāmu vielu, netiks izpildīts attiecībā uz dažām ķīmiskajām vielām, kuras būtu klasificētas kā viegli bionoārdāmas, ja izmantotu izšķīdušā organiskā oglekļa (turpmāk – DOC) noārdīšanos.
4. Ja noārdīšanās īpatsvars ir mazāks, nekā prognozēts, iespējams, ka neorganiskais ogleklis akumulējas testēšanas šķīdumā. Tādā gadījumā noārdīšanos var novērtēt ar citiem vieglas bionoārdīšanās testiem.
5. Citu *Sturm* metodikas trūkumu (sarežģīta, ilgstoša procedūra, kurā pastāv lielāka eksperimentālu kļūdu iespēja un kura nav izmantojama gaistošām ķīmiskajām vielām) dēļ tika piemēroti centieni, lai papildus *Gledhill* sāktu izmantot citus hermētiski noslēgtu trauku paņēmienus, nevis gāzes caurplūdi (10) (11). *Boatman et al.* (12) pārskatīja iepriekšējās metodes un pieņēma noslēgta brīvā tilpuma sistēmu, kurā inkubācijas beigās CO_2 izlaiž brīvajā tilpumā, izmantojot barotnes paskābināšanu. CO_2 mērija ar gāzu hromatogrāfijas/neorganiskā oglekļa analīzi automātiski paņemtos paraugos no brīvā tilpuma, bet netika ņemts vērā izšķīdušais neorganiskais ogleklis (turpmāk – DIC) šķīdrajā fāzē. Turklāt izmantotie trauki bija ļoti mazi (20 ml) un saturēja tikai 10 ml barotnes, kas radīja problēmas, piemēram, kad bija obligāti jāpievieno ļoti mazi daudzumi nešķīstošu testējamo ķīmisko vielu, un/vai barotnē ar sējmateriālu varēja trūkt vai vispār nebūt mikroorganismu, kuri spētu noārdīt testējamās ķīmiskās vielas.
6. Minētās problēmas ir pārvarētas neatkarīgos *Struijs* un *Stoltenkamp* (13) un *Birch* un *Fletcher* (14) pētījumos. *Birch* un *Fletcher* pētījumu pamatā bija šo autoru pieredze ar iekārtu, ko izmanto anaerobās bionoārdīšanās testā (15). Pirmajā minētajā metodē (13) CO_2 mēra brīvajā tilpumā pēc paskābināšanas un līdzsvara iestāšanās, savukārt otrajā (14) mēra DIC gan gāzes fāzē, gan šķīdrajā fāzē, neveicot apstrādi. Šķīdrajā fāzē konstatēja vairāk nekā 90 % radušās neorganiskā oglekļa. Abas metodes nodrošināja priekšrocības salīdzinājumā ar *Sturm* testu, jo to testēšanas sistēma bija kompaktāka un vieglāk pārvaldāma, ar tām var testēt gaistošas ķīmiskās vielas un var novērst radušās CO_2 mērīšanas kavēšanas.
7. Abas pieejas apvienoja ISO Brīvā tilpuma CO_2 standartā (16), kam veica salīdzinošo izpēti (17), un tieši šis standarts ir šīs testēšanas metodes pamatā. Līdzīgā veidā šīs abas pieejas ir izmantotas ASV EPA metodē (18). Saskaņā ar ieteikumiem ir izmantojamas divas CO_2 mērīšanas metodes, proti, mēra CO_2 brīvajā tilpumā pēc paskābināšanas (13) un neorganisko oglekli šķīdrajā fāzē pēc pārsātināšanas ar sārmu. Otro minēto metodi ieviesa *Peterson* šīs brīvā tilpuma metodes, kura bija pielāgota potenciālās bionoārdīšanās noteikšanai, CONCAWE salīdzinošās izpētes laikā (19). Izmaiņas, kas ieviestas šā pielikuma C.4. nodaļas vieglās bionoārdīšanās noteikšanas metožu 1992. gada (20) pārskatīšanas laikā, ir ieviestas arī šajā testēšanas metodē, lai apstākļi (barotne, ilgums utt.) būtu tādi paši kā pārskatītajā *Sturm* testā (20). *Birch* un *Fletcher* (14) ir parādījuši, ka ar šo brīvā tilpuma testu iegūst ļoti līdzīgus rezultātus tiem, ko ar tām pašām ķīmiskajām vielām ieguva ESAO veiktajā pārskatīto testēšanas metožu salīdzinošajā izpētē (21).

TESTĒŠANAS PRINCIPS

8. Testējamo ķīmisko vielu, parasti 20 mg C/l, kā vienīgo oglekļa un enerģijas avotu inkubē minerālsāļu buferšķīdumā, kas ir apsēts ar jauktu mikroorganismu populāciju. Testēšanu veic hermētiski noslēgtās pudelēs ar brīvo tilpumu, kurā atrodas gaiss, kas nodrošina skābekļa rezervuāru aerobās bionoārdīšanās vajadzībām. CO_2 veidošanos, ko izraisa testējamās ķīmiskās vielas galīgā aerobā bionoārdīšanās, nosaka, izmērot, cik lielā mērā neorganiskā oglekļa daudzums testa pudelēs pārsniedz neorganiskā oglekļa daudzumu tukšajos traukos, kas satur tikai barotni ar sējmateriālu. Bionoārdīšanās pakāpi izsaka kā īpatsvaru no teorētiski radītā maksimālā neorganiskā oglekļa (turpmāk – ThIC), pamatojoties uz sākotnēji pievienoto testējamās ķīmiskās vielas daudzumu (kā organisko oglekli).
9. Var noteikt arī DOC piesaisti un/vai testējamās ķīmiskās vielas primārās bionoārdīšanās pakāpi (20).

INFORMĀCIJA PAR TESTĒJAMO ĶĪMISKO VIELU

10. Lai noteiktu noārdīšanās pakāpi, jāzina testējamās ķīmiskās vielas organiskā oglekļa saturs (masas %), kuru nosaka vai nu pēc ķīmiskās struktūras, vai izmērot. Lai noteiktu piemērotu brīvā tilpuma un šķidruma tilpuma attiecību gaistošām testējamām ķīmiskajām vielām, noder izmērīta vai aprēķināta Henrija likuma konstante. Informācija par testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti attiecībā uz mikroorganismiem ir lietderīga, lai izraudzītos atbilstīgu testēšanas koncentrāciju un lai interpretētu vājas bionoārdīšanās spējas rezultātus, proti, ir ieteicams ietvert inhibēšanas pārbaudi, ja vien nav zināms, ka testējamā ķīmiskā viela nav inhibējoša attiecībā uz mikrobu darbību (sk. 24. punktu).

METODES PIEMĒROTĪBA

11. Tests ir piemērojams ūdenī šķīstošām un arī nešķīstošām testējamām ķīmiskajām vielām, bet ir jānodrošina laba testējamās ķīmiskās vielas dispersija. Izmantojot ieteikto brīvā tilpuma un šķidruma tilpuma attiecību 1:2, var testēt gaistošas ķīmiskās vielas, kuru Henrija likuma konstante nepārsniedz $50 \text{ Pa} \cdot \text{m}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$, jo testējamās ķīmiskās vielas daļa brīvajā tilpumā nepārsniedz 1 % (13). Var izmantot mazāku brīvo tilpumu, ja testē ķīmiskās vielas, kuru gaistamība ir lielāka, bet kuru bioloģiskā pieejamība var būt ierobežota, it sevišķi, ja tās ir ūdenī mazšķīstošas. Tomēr lietotājiem ir jānodrošina, ka brīvā tilpuma un šķidruma tilpuma attiecība un testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija ir tāda, ka ir pieejams pietiekams skābekļa daudzums, kas pieļautu pilnīgu aerobu bionoārdīšanos (piemēram, nav ieteicama augsta substrāta koncentrācija un mazs brīvais tilpums). Norādījumi par šo jautājumu ir pieejami atsaucē (13) un (23).

ĶĪMISKĀS STANDARTVIELAS

12. Lai pārbaudītu testēšanas procedūru, paralēli ir jātestē ķīmiskā standartviela ar zināmu bionoārdīšanās spēju. Šim nolūkam var izmantot anilīnu, nātrija benzoātu vai etilēnglikolu, ja testē ūdenī šķīstošas testējamās ķīmiskās vielas, un 1-oktanolu, ja testē mazšķīstošas testējamās ķīmiskās vielas (13). Šo ķīmisko vielu *ThIC* bionoārdīšanās pakāpi 14 dienu laikā jāsasniedz > 60 %.

ATKĀRTOJAMĪBA

13. ISO veiktajā metodes salīdzinošajā izpētē (17), kurā nodrošināja ieteiktos apstākļus, tostarp testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju 20 mg C/l, tika iegūti turpmāk norādītie rezultāti.

Testējamā ķīmiskā viela	Vidējais bionoārdīšanās īpatsvars (28 dienās)	Mainības koeficients (%)	Laboratoriju skaits
Anilīns	90	16	17
1-oktanolis	85	12	14

Izmantojot anilīnu, mainība (atkārtojamība) viena testa ietvaros bija zema, mainības koeficientiem nepārsniedzot 5 % gandrīz visās testēšanas sērijās. Divos gadījumos, kuros atkārtojamība bija zemāka, lielāka mainība, iespējams, tika novērota augsta radītā neorganiskā oglekļa līmeņa dēļ tukšajos traukos. Testos ar 1-oktanolu atkārtojamība bija sliktāka, bet joprojām zem desmit procentiem 79 % testēšanas sēriju. Šī paaugstinātā mainība viena testa ietvaros varētu būt attiecināma uz dozēšanas kļūdām, jo hermētiski noslēgtajās testēšanas pudelēs bija jānāc neliels daudzums (3–4 µl) 1-oktanola. Augstākus mainības koeficientus iegūtu pie testējamās ķīmiskās vielas mazākām koncentrācijām, it sevišķi pie koncentrācijām zem 10 mg C/l. To daļēji varētu novērst, samazinot kopējā neorganiskā oglekļa (turpmāk – *TIC*) koncentrāciju sējmateriālā.

14. ES salīdzinošajā izpētē (24) par piecām virsmaktīvajām vielām, ko pievieno koncentrācijā 10 mg C/l, ieguva turpmāk norādītos rezultātus.

Testējamā ķīmiskā viela	Vidējais bionoārdīšanās īpatsvars (28 dienās)	Mainības koeficients (%)	Laboratoriju skaits
Tetrapropilēnben-zolsulfonāts	17	45	10
Diizooktilsulfosuk-cināts (anjonu)	72	22	9
Heksadeciltrimetil- (*) amonija hlorīds (katjonu)	75	13	10

Testējamā ķīmiskā viela	Vidējais bionoārdīšanās īpatsvars (28 dienās)	Mainības koeficients (%)	Laboratoriju skaits
Izononilfenol(etok-silāts) ₉ (nejonu)	41	32	10
Kokamidpropildi- metilhidroksisulfo- betaīns (amfotērs)	60	23	11

(*) Tika pievienots SiO₂, lai neitralizētu toksicitāti.

Rezultāti parāda, ka kopumā mainība bija augstāka attiecībā uz virsmaktīvajām vielām ar vajāku labas noārdīšanās spēju. Mainība viena testa ietvaros bija zem 15 % vairāk nekā 90 % gadījumu, augstākajam līmenim sasniedzot 30–40 %.

PIEZĪME. Lielākā daļa virsmaktīvo vielu nav vienkāršas molekulāras vielas, bet gan ir izomēru, homologo utt. maisījumi, kam ir raksturīgi atšķirīgi noārdīšanās kavējuma periodi un atšķirīgi kinētiskie koeficienti, un tā rezultātā veidojas neskaidras, vāji izteiktas līknes, tāpēc vajadzīgā 60 % apstiprināšanas vērtība “10 dienu laikposmā” var palikt nesasniegta, pat ja katra atsevišķā molekulārā struktūra sasniegtu > 60 % 10 dienu laikā, ja to testētu atsevišķi. To var novērot arī citos sarežģītos maisījumos.

METODES APRAKSTS

Iekārta

15. Parastās laboratorijas iekārtas un:

- stikla seruma pudeles, kas hermētiski noslēgtas ar butilgumijas aizbāžņiem un gofrētiem alumīnija vāciņiem; ieteicamais izmērs ir 125 ml, kura kopējais tilpums ir aptuveni 160 ml (tādā gadījumā katras pudeles tilpumam jābūt 160 ± 1 ml); var izmantot mazāka izmēra trauku, ja rezultāti atbilst 66. un 67. punktā aprakstītajiem nosacījumiem;
- oglekļa analizators vai cits instruments (piemēram, gāzes hromatogrāfs), ar ko varētu mērīt neorganisko oglekli;
- šļircs ar augstu precizitātes pakāpi gāzveida un šķidrajiem paraugiem;
- orbitālais kratītājs termostatējamā vidē;
- gaisa bez CO₂ piegāde – to var sagatavot, gaisu laižot cauri natronkaļķa granulām vai izmantojot 80 % N₂/20 % O₂ gāzu maisījumu (fakultatīvi) (sk. 28. punktu);
- membrānfiltrēšanas ierīce ar 0,20–0,45 μm porām (fakultatīvi);
- organiskā oglekļa analizators (fakultatīvi).

Reāģenti

16. Visā testēšanā jāizmanto analītiski tīri reaģenti.

Ūdens

17. Jāizmanto destilēts vai dejonizēts ūdens, kura organiskā oglekļa kopējais saturs ir ≤ 1 mg/l. Tas veido ≤ 5 % no sākotnējā organiskā oglekļa satura, kas pievienots ar ieteikto testējamās ķīmiskās vielas devu.

Minerālsāļu barotnes rezerves šķidumi

18. Minerālsāļu barotnes rezerves šķidumi ir līdzīgi šķidumiem, kas noteikti ISO 14593 (16) un C.4. nodaļas vieglas bionoārdīšanās testiem (20). Amonija hlorīda augstākā koncentrācija (2,0 g/l apmērā 0,5 g/l vietā) jāizmanto tikai izņēmuma gadījumos, piemēram, kad testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija ir > 40 mg C/l. Rezerves šķidumi ir jāglabā ledusskapī un no tiem jāatbrīvojas pēc sešiem mēnešiem vai ātrāk, ja ir novērota nogulsēšanās vai mikrobu vairošanās. Jāsagatavo šādi rezerves šķidumi:

a) kālija dihidrogēnfosfāts (KH_2PO_4) 8,50 g,

dikālija hidrogēnfosfāts (K_2HPO_4) 21,75 g,

dinātrija hidrogēnfosfāta dihidrāts ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 33,40 g,

amonija hlorīds (NH_4Cl) 0,50 g,

kas jāizšķīdina ūdenī un jāuzpilda līdz 1 litra tilpumam; šā šķīduma pH jābūt 7,4 ($\pm 0,2$); ja tas tā nav, jā sagatavo jauns šķīdums;

b) kalcija hlorīda dihidrāts ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 36,40 g,

kas jāizšķīdina ūdenī un jāuzpilda līdz 1 litra tilpumam;

c) magnija sulfāta heptahidrāts ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22,50 g,

kas jāizšķīdina ūdenī un jāuzpilda līdz 1 litra tilpumam;

d) dzelzs (III) hlorīda heksahidrāts ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0,25 g,

kas jāizšķīdina ūdenī un jāuzpilda līdz 1 litra tilpumam un kam jāpievieno viens piliens koncentrētas HCl.

Minerālbarotņu sagatavošana

19. Jāsajauc 10 ml a) apakšpunkta šķīduma ar aptuveni 800 ml ūdens (17. punkts), jāpievieno pa 1 ml no b), c) un d) apakšpunktā norādītajiem šķīdumiem un jāpapildina tilpumā līdz 1 litram, pievienojot ūdeni (17. punkts).

Citi reaģenti

20. Koncentrēta ortofosforskābe (H_3PO_4) (> 85 % masas uz tilpumu).

Nātrija hidroksīda šķīdums 7M

21. Jāizšķīdina 280 g nātrija hidroksīda (NaOH) vienā litrā ūdens (17. punkts). Jānosaka šā šķīduma DIC koncentrācija, un šī vērtība jāņem vērā, aprēķinot testēšanas rezultātu (sk. 55. un 61. punktu), it sevišķi saistībā ar 66. punkta b) apakšpunktā noteikto derīguma kritēriju. Ja DIC koncentrācija ir pārāk augsta, jā sagatavo svaigs šķīdums.

Testējamā ķīmiskā viela

22. Jā sagatavo rezerves šķīdums no ūdenī pietiekami šķīstošas testējamās ķīmiskās vielas un ūdens (17. punkts) vai testēšanas barotnes (19. punkts) koncentrācijā, kam vēlams būt 100 reizes augstākai nekā galīgajai koncentrācijai, ko izmantos testēšanā. Var būt nepieciešams koriģēt rezerves šķīduma pH. Rezerves šķīdums ir jāpievieno minerālbarotnei, lai galīgā organiskā oglekļa koncentrācija būtu 2–40 mg C/l diapazonā, vēlams, 20 mg C/l. Ja izmanto zemākas koncentrācijas, var būt apdraudēta iegūtā precizitāte. Šķīstošas un nešķīstošas šķīdīgas ķīmiskās vielas traukos var pievienot tieši, izmantojot augstas precizitātes šļirci. Mazšķīstošām un nešķīstošām testējamām ķīmiskajām vielām var būt vajadzīga īpaša apstrāde (25). Ir šādas izvēles:

a) zināmu nosvērtu daudzumu tieša pievienošana;

b) ultraskaņas dispersija pirms pievienošanas;

c) dispersija ar emulgatoru palīdzību, kas ir vajadzīga, lai pirms pievienošanas noteiktu, vai testējamām ķīmiskajām vielām ir jebkāda inhibējoša vai stimulējoša ietekme uz mikrobu darbību;

d) šķīdru testējamo ķīmisko vielu adsorbēcija vai šķīdums piemērotā gaistošā šķīdinātājā uz inerti barotni vai balstu (piemēram, stikla šķiedras filtru), kam seko šķīdinātāja iztvaikošana, ja tādu izmantoja, un zināmu daudzumu tieša pievienošana;

e) zināma daudzuma testējamās ķīmiskās vielas šķīduma viegli gaistošā šķīdinātājā pievienošana tukšam testēšanas traukam, kam seko šķīdinātāja iztvaikošana.

Preparāti vai šķīdinātāji, kas izmantoti c), d) un e) apakšpunktā, ir jātestē, lai noteiktu to stimulējošo vai inhibējošo ietekmi uz mikrobu darbību (sk. 42. punkta b) apakšpunktu).

Ķīmiskā standartviela

23. Jāsigatavo (šķīstošas) ķīmiskās standartvielas rezerves šķīdums ūdenī (17. punkts) koncentrācijā, kam vēlams būt 100 reizes augstākai nekā galīgajai koncentrācijai, ko izmantos testēšanā (20 mg C/l).

Inhibējošas ietekmes pārbaude

24. Testējamās ķīmiskās vielas nereti neuzrāda nekādu ievērojamu noārdīšanos apstākļos, ko izmanto vieglas bionoārdīšanās novērtējumos. Viens no iespējamiem iemesliem ir tas, ka testējamai ķīmiskajai vielai testēšanā izmantotajā koncentrācijā ir inhibējoša ietekme uz sējmateriālu. Inhibējošas ietekmes pārbaudi var ietvert testēšanas plānā, lai atvieglotu inhibēšanas identifikāciju (retrospektīvi) kā iespējamo cēloni vai veicinošu faktoru. Alternatīvā gadījumā inhibējošas ietekmes pārbaude var izslēgt šādus traucējumus un parādīt, ka nekāda vai neliela noārdīšanās ir attiecināma vienīgi uz mikrobu darbības neiespējamību attiecīgajos testēšanas apstākļos. Lai iegūtu informāciju par testējamās ķīmiskās vielas toksicitāti attiecībā uz (aerobiem) mikroorganismiem, jāpagatavo šķīdums testēšanas barotnē, kas satur testējamo ķīmisko vielu un ķīmisko standartvielu (19. punkts), katru attiecīgi tādā koncentrācijā, kādā pievienota (sk. 22. un 23. punktu).

Sējmateriāls

25. Sējmateriālu var iegūt no dažādiem avotiem, proti, no aktīvajām dūņām, attīrītiem notekūdeņiem (bez hlora), virszemes ūdeņiem un augsnēm vai iepriekš minēto maisījuma (20). Izmantojot ķīmisko standartvielu, jāpārbauda avota bionoārdīšanās aktivitāte. Neatkarīgi no avota nedrīkstētu izmantot mikroorganismus, kas iepriekš pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai, ja procedūru izmantos kā vieglas bionoārdīšanās testu.

Brīdinājums. Aktīvās dūņas, notekūdeņi un attīrīti notekūdeņi satur patogēnus organismus, un ar tiem jārīkojas piesardzīgi.

26. Pamatojoties uz pieredzi, sējmateriāla optimālais daudzums ir tāds, kas:

- ir pietiekams, lai nodrošinātu atbilstīgu bionoārdīšanās darbību,
- noārda paredzēto īpatnību ķīmiskās standartvielas (sk. 66. punktu),
- nodrošina 10^2 – 10^5 koloniju veidošanas vienību katrā galīgā maisījuma mililitrā,
- parasti nodrošina suspendēto cieta daļiņu koncentrāciju 4 mg/l apmērā galīgajā maisījumā, ja izmanto aktīvās dūņas; var izmantot koncentrācijas līdz 30 mg/l apmērā, bet tās var būtiski palielināt CO₂ veidošanos tukšajos traukos (26),
- par mazāk nekā 10 % papildina organiskā oglekļa sākotnējo koncentrāciju, ko nodrošināja ar testējamo ķīmisko vielu,
- parasti ir 1–10 ml sējmateriāla 1 litrā testēšanas šķīduma.

Aktīvās dūņas

27. Svaigas aktīvās dūņas tiek savāktas no aerācijas tvertnes notekūdeņu attīrīšanas iekārtā vai laboratorijas blokā, kas galvenokārt attīra sadzīves notekūdeņus. Ja vajadzīgs, rupjās daļiņas izvāc, veicot sijāšanu (piemēram, izmantojot sietu ar 1 mm² acu izmēru), un dūņas līdz to izmantošanai ir jāuztur aerobas.
28. Pēc rupjo daļiņu izvākšanas dūņām var arī ļaut nogulsnēties vai tās var centrifugēt (piemēram, 1 100 × g uz 10 minūtēm). Dzidrais šķīdums ir jāizlej. Dūņas var noskalot ar minerālu šķīdumu. Koncentrētās dūņas jāsuspendē minerālbarotnē, lai iegūtu suspendēto daļiņu koncentrāciju 3–5 g suspendēto daļiņu/l apmērā, un dūņas līdz to izmantošanai ir jāuztur aerobas.
29. Dūņas jāņem no pienācīgi funkcionējošas tradicionālas attīrīšanas iekārtas. Ja dūņas jāņem no attīrīšanas iekārtas, kas darbojas ar lielu jaudu, vai ja ir aizdomas, ka dūņas satur inhibitorus, tās ir jāmazgā. Pēc rūpīgas samaisīšanas atkārtoti suspendētajām dūņām ļauj nogulsnēties vai tās centrifugēt, atbrīvojot no dzidrā šķīduma un nomazgātās dūņas atkal suspendē papildu daudzumā minerālbarotnes. Šī procedūra ir jāatkārto, līdz dūņas uzskatāmas par attīrītām no substrātu vai inhibitoru pārpalikumiem.
30. Pēc pilnīgas atkārtotas suspensijas panākšanas vai neattīrītu dūņu gadījumā jāpaņem paraugs tieši pirms izmantošanas, lai noteiktu suspendēto cieta daļiņu sauso svaru.

31. Aktivās dūņas var arī homogenizēt (3–5 g suspendēto daļiņu/l). Dūņas ir divas minūtes jāmaisā *Waring* jaucējā ar vidēju ātrumu. Samaisītajām dūņām ļauj 30 minūtes vai, ja vajadzīgs, ilgāk nogulsņēties un šķidrumu dekantē izmantošanai par sējmateriālu aptuveni 10 ml/l minerālbarotnes apmērā.
32. Vēl vairāk CO₂ veidošanos tukšajos traukos var samazināt, aerējot dūņas uz nakti ar gaisu bez CO₂. Šajā testā kā sējmateriāla koncentrācija jāizmanto 4 mg/l aktīvo dūņu cieto daļiņu (13).

Sekundārs attīrītais notekūdens

33. Sējmateriālu var arī iegūt no sekundāra attīrīta notekūdens no attīrīšanas iekārtas vai laboratorijas bloka, kas galvenokārt saņem sadzīves notekūdeņus. Paraugs jāuzglabā aerobos apstākļos un jāizmanto savākšanas dienā vai jākondicionē, ja vajadzīgs. Attīrītais notekūdens jāfiltrē cauri filtram ar rupjām porām, lai to atbrīvotu no lielām daļiņām, un ir jānosaka pH vērtība.
34. Lai samazinātu filtrāta neorganiskā oglekļa saturu, filtrātu apsmidzina ar gaisu bez CO₂ (15. punkta e) apakšpunkts) vienu stundu, vienlaikus uzturot pH 6,5 vērtībā ar ortofosforskābes palīdzību (20. punkts). pH vērtību atjauno tās sākotnējā vērtībā ar nātrija hidroksīda palīdzību (21. punkts), un aptuveni pēc vienas stundas nogulsņēšanās paņem piemērotu daudzumu dzidrā šķīdumā, lai to izmantotu sējmateriālam. Šī smidzināšanas procedūra samazina sējmateriāla neorganiskā oglekļa saturu. Piemēram, ja par sējmateriālu izmantoja maksimālo ieteikto tilpumu filtrēta un apsmidzināta attīrīta notekūdens (100 ml) uz litru, neorganiskā oglekļa daudzums tukšos kontroles traukos bija 0,4–1,3 mg/l diapazonā (14), kas ir 2–6,5 % no testējamās ķīmiskās vielas oglekļa 20 mg C/l apmērā un 4–13 % – 10 mg C/l apmērā.

Virszemes ūdeņi

35. Ir jāpaņem atbilstīgu virszemes ūdeņu paraugs. Tas jātur aerobos apstākļos un jāizmanto savākšanas dienā. Paraugs jākoncentrē, ja vajadzīgs, to filtrējot vai centrifugējot. Sējmateriāla daudzumam, ko izmanto katrā testēšanas traukā, ir jāatbilst 26. punktā norādītajiem kritērijiem.

Augsnes

36. Ir jāpaņem atbilstīgas augsnes paraugs, ko savāc 20 cm dziļumā zem augsnes virsmas. Akmeņi, augu atliekas un bezmugurkaulnieki ir jāizņem no augsnes parauga, pirms to sijā cauri sietam ar 2 mm acs izmēru (ja paraugs ir pārāk mitrs, lai to nekavējoties sijātu, daļēji žāvēšana ar gaisu palīdzēs to izsijāt). Paraugs jātur aerobos apstākļos un jāizmanto savākšanas dienā (ja paraugu transportē vaļīgi aizsietā melna polietilēna maisiņā, to šajā maisiņā var uzglabāt 2–4 °C līdz vienam mēnesim).

Sējmateriāla iepriekšēja kondicionēšana

37. Sējmateriālu var iepriekš kondicionēt testēšanas apstākļiem, bet nedrīkst iepriekš adaptēt testējamai ķīmiskajai vielai. Iepriekšēja kondicionēšana var samazināt CO₂ veidošanos tukšajos traukos. Iepriekšēja kondicionēšana ietver aktīvo dūņu aerāciju pēc atšķaidīšanas testēšanas barotnē līdz 30 mg/l ar mitru gaisu bez CO₂ līdz 5–7 dienām testēšanas temperatūrā.

TESTĒŠANAS PROCEDŪRA

Pudeļu skaits

38. Testēšanai vajadzīgo pudeļu skaits (15. punkta a) apakšpunkts) būs atkarīgs no analīžu regularitātes un testēšanas ilguma.
39. Ir ieteicams pēc tam, kad ir noteikts pietiekams skaits laika intervālu, piemēram, 10 dienu laikposms, katru reizi analizēt trīs pudeles. Turklāt testēšanas beigās analizē vismaz piecas testēšanas pudeles (15. punkta a) apakšpunkts) no a), b) un c) apakšpunkta kopumiem (sk. 42. punktu), lai nodrošinātu iespēju aprēķināt 95 % ticamības intervālus attiecībā uz vidējo bionoārdīšanās īpatsvara vērtību.

Barotne ar sējmateriālu

40. Sējmateriālu izmanto aktīvo dūņu sausu cieto daļiņu koncentrācijā 4 mg/l. Tieši pirms izmantošanas ir jāpagatavo pietiekams daudzums barotnes ar sējmateriālu, piemēram, 2 ml atbilstīgi apstrādātu aktīvo dūņu (27.–32. punkts) koncentrācijā 2 000 mg/l pievienojot 1 litram minerālsāļu barotnes (19. punkts). Ja izmanto sekundāru attīrīta notekūdeni, jāpievieno līdz 100 ml attīrīta notekūdens (33. punkts) 900 ml minerālsāļu barotnes (19. punkts) un jāatšķaida līdz 1 litra tilpumam ar barotni.

Pudeļu sagatavošana

41. Barotnes ar sējmateriālu alikvoti ir jāiepilda atkārtojumu pudelēs, nodrošinot brīvā tilpuma un šķidruma tilpuma attiecību 1:2 (piemēram, jāpievieno 107 ml pudelēs, kuru tilpums ir 160 ml). Var izmantot citas attiecības, bet jāņem vērā 11. punktā ietvertais brīdinājums. Izmantojot cita veida sējmateriālu, ir jāraugās, lai barotne ar sējmateriālu būtu pienācīgi samaisīta, lai nodrošinātu tās vienmērīgu izkliedi testēšanas pudelēs.
42. Sagatavo pudeļu kopumus (15. punkta a) apakšpunkts), nodrošinot:
- a) testēšanas traukus (apzīmēti ar F_T), kuros ir testējamā ķīmiskā viela;
 - b) tukšus kontroles traukus (apzīmēti ar F_B), kuros ir tikai testēšanas barotne un sējmateriāls; jāpievieno arī ķīmiskās vielas, šķīdinātāji, preparāti vai stikla šķiedras filtri, ko izmanto, lai testēšanas traukos pievienotu testējamo ķīmisko vielu;
 - c) traukus (apzīmēti ar F_C), kuros ir ķīmiskā standartviela, lai pārbaudītu procedūru;
 - d) ja vajadzīgs, traukus (apzīmēti ar F_I), kuros ir gan testējamā ķīmiskā viela, gan ķīmiskā standartviela tādās pašās koncentrācijās (24. punkts) kā attiecīgi pudelēs F_T un F_C , lai pārbaudītu testējamās ķīmiskās vielas iespējamu inhibējošu ietekmi;
 - e) traukus (apzīmēti ar F_S), lai pārbaudītu iespējamu abiotisku noārdīšanos; šie trauki atbilst traukiem a) apakšpunktā, bet papildus satur 50 mg/l $HgCl_2$ vai ir sterilizēti citā veidā (piemēram, autoklāvā).
43. Ūdenī šķīstošās testējamās ķīmiskās vielas un ķīmiskās standartvielas pievieno kā ūdenī pagatavotus rezerves šķīdumus (22., 23. un 24. punkts), lai nodrošinātu koncentrāciju 10–20 mg C/l apmērā.
44. Nešķīstošās testējamās ķīmiskās vielas un nešķīstošās ķīmiskās standartvielas pudelēs pievieno dažādos veidos (sk. 22. punkta a)–e) apakšpunktu) atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas īpašībām, proti, vai nu pirms, vai pēc barotnes ar sējmateriālu pievienošanas atkarībā no testējamās ķīmiskās vielas attīrīšanas metodes. Ja izmanto kādu no 22. punkta a)–e) apakšpunktā uzskaitītajām procedūrām, tukšās pudeles F_B (42. punkta b) apakšpunkts) ir jāapstrādā līdzīgā veidā, tikai izņemot testējamo ķīmisko vielu vai ķīmisko standartvielu.
45. Gaistošās testējamās ķīmiskās vielas jāinjicē hermētiski noslēgtajās pudelēs (47. punkts) ar mikrošļirci. Devu aprēķina no injicētā daudzuma un testējamās ķīmiskās vielas blīvuma.
46. Traukos jāpievieno ūdens, ja vajadzīgs, lai visos traukos būtu vienāds šķidruma tilpums. Jānodrošina, lai brīvā tilpuma un šķidruma attiecība (parasti 1:2) un testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija būtu tādas, ka brīvajā tilpumā ir pieejams pietiekams daudzums skābekļa, lai būtu iespējama pilnīga bionoārdīšanās.
47. Pēc tam visas pudeles hermētiski noslēdz, piemēram, ar butilgumijas aizbāžņiem un alumīnija vāciņiem. Gaistošās testējamās ķīmiskās vielas jāpievieno šajā posmā (45. punkts). Ja ir jāuzrauga testējamās ķīmiskās vielas DOC koncentrācijas samazināšanās, kā arī jāveic nulles laika analīzes saistībā ar sākotnējās neorganiskā oglekļa koncentrācijas (sterili kontroles trauki, 42. punkta e) apakšpunkts) vai citu vērtību noteikšanu, no testēšanas trauka ir jāņem atbilstīgs paraugs. Pēc tam atbrīvojas no testēšanas trauka un tā satura.
48. Hermētiski noslēgtās pudeles ievieto rotējošā kratītājā (15. punkta d) apakšpunkts) ar kratīšanas ātrumu, kas ir pietiekams, lai pudeles saturs tiktu uzturēts pienācīgi samaisīts un suspensijā (piemēram, 150–200 rpm), un inkubē tumsā $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Paraugu ņemšana

49. Paraugu ņemšanas pieeja būs atkarīga no testējamās ķīmiskās vielas bionoārdīšanās kavējuma perioda un kinētiskā ātruma. Paraugu ņemšanas dienā atbrīvojas no pudelēm, no kurām ņem paraugus analīzēm, un tam jānotiek vismaz reizi nedēļā vai biežāk (piemēram, divreiz nedēļā), ja ir vajadzīga pilnīgas noārdīšanās likne. Vajadzīgo skaitu atkārtojumu pudeļu (F_T , F_B un F_C , kā arī F_I un F_S , ja tās izmanto) izņem no kratītāja (sk. 42. punktu). Testēšana parasti ilgst 28 dienas. Ja bionoārdīšanās likne norāda, ka plato ir sasniegts, pirms pagājušas 28 dienas, testēšanu var pabeigt ātrāk. Analīzes veikšanai jāņem paraugi no piecām pudelēm, kas rezervētas testēšanas 28. dienai, un jāizmanto rezultāti, lai aprēķinātu bionoārdīšanās īpatsvara ticamības robežas vai mainības koeficientu. No pudelēm, kas paredzētas inhibējošas ietekmes un abiotiskas noārdīšanās pārbaudēm, paraugi nav jāņem tik bieži kā no pārējām pudelēm, pietiek ar paraugiem 1. un 28. dienā.

Neorganiskā oglekļa (IC) analīze

50. CO₂ veidošanos pudelēs nosaka, mērot neorganiskā oglekļa koncentrācijas palielināšanos inkubācijas laikā. Testēšanas laikā radītā neorganiskā oglekļa daudzuma mērīšanai ir pieejamas divas ieteicamas metodes, kas aprakstītas turpmāk. Tā kā šīs metodes var sniegt nedaudz atšķirīgus rezultātus, vienā testēšanas sērijā jāizmanto tikai viena no metodēm.
51. A metode tiek ieteikta gadījumā, ja barotne, visticamāk, satur, piemēram, stikla filtrpapīra atliekas un/vai nešķīstošu testējamo ķīmisko vielu. Šo analīzi var veikt, izmantojot gāzes hromatogrāfu, ja nav pieejams oglekļa analizators. Ir svarīgi, lai pudeles atrastos testēšanas vai līdzīgā temperatūrā, kad tiek analizēta brīvā tilpuma gāze. B metode var būt vieglāk izmantojama laboratorijās, kas neorganiskā oglekļa mērījumiem izmanto oglekļa analizatoru. Ir svarīgi, lai nātrija hidroksīda šķīdums (21. punkts), ko izmanto CO₂ pārveidošanai karbonātā, ir vai nu svaigi sagatavots, vai ir zināms tā neorganiskā oglekļa saturs, lai to varētu ņemt vērā, aprēķinot testēšanas rezultātus (sk. 66. punkta b) apakšpunktu).

A metode – paskābināšana līdz pH < 3 apmērā

52. Pirms katras analīžu sērijas neorganiskā oglekļa analizatoru kalibrē, izmantojot atbilstīgu neorganiskā oglekļa standartu (piemēram, 1 (masas) % CO₂, kas atrodas N₂). Koncentrētu ortofosforskābi (20. punkts) injicē caur katras paraugiem izmantotās pudeles aizbāzni, lai pazeminātu barotnes pH līdz < 3 (piemēram, 107 ml testēšanas barotnes pievieno 1 ml). Pudeles ievieto atpakaļ kratītājā. Pēc vienu stundu ilgās kratīšanas testēšanas temperatūrā pudeles izņem no kratītāja un no katras pudeles brīvā tilpuma paņem gāzes alikvotus (piemēram, 1 ml), ko injicē neorganiskā oglekļa analizatorā. Izmērītās neorganiskā oglekļa koncentrācijas reģistrē kā mg C/l.
53. Šīs metodes princips ir tāds, ka pēc paskābināšanas līdz pH < 3 un līdzsvara iestāšanās 20 °C līdzsvara konstante CO₂ izkliedei starp šķidro un gāzes fāzi testēšanas pudelēs ir 1,0, ja to mēra kā koncentrāciju (13). Tas attiecībā uz testēšanas sistēmu ir jāpierāda vismaz vienu reizi. To dara, kā aprakstīts turpmāk.

Sagatavo pudeles, kurās ir 5 un 10 mg/l kā neorganiskais ogleklis, izmantojot bezūdens nātrija karbonāta (Na₂CO₃) šķīdumu ūdenī bez CO₂, kurš pagatavots, paskābinot ūdeni līdz pH 6,5 apmērā ar koncentrētu ortofosforskābi (20. punkts) un uz nakti apsmidzinot to ar gaisu bez CO₂, kā arī paaugstinot pH līdz neitrālam līmenim ar sārmiem. Nodrošina, ka brīvā tilpuma un šķidrums tilpuma attiecība ir tāda pati kā testēšanā (piemēram, 1:2). Paskābina un ļauj iestāties līdzsvaram, kā aprakstīts 52. punktā, un izmēra neorganiskā oglekļa koncentrācijas gan brīvajā tilpumā, gan šķidrās fāzēs. Pārlicinās, ka abas koncentrācijas ir vienādas testēšanas kļūdas robežās. Ja tās nav vienādas, lietotājam ir jāpārskata procedūras. Šī neorganiskā oglekļa izkliedes starp šķidro un gāzes fāzi pārbaude nav jāveic katrā testēšanas reizē. To, iespējams, varētu veikt kalibrēšanas laikā.

54. Ja ir jānosaka DOC noārdīšanās (tikai ūdenī šķīstošām testējamām ķīmiskajām vielām), paraugi jāņem no šķidrās fāzes no atsevišķām (nepaskābinātām) pudelēm, jāfiltrē cauri membrānai un jāinjicē DOC analizatorā. Šīs pudeles pēc vajadzības var izmantot citām analīzēm, lai noteiktu primāro bionoārdīšanos.

B metode – CO₂ pārvēršana karbonātā

55. Pirms katras analīžu sērijas neorganiskā oglekļa analizatoru kalibrē, izmantojot atbilstīgu standartu, piemēram, nātrija bikarbonāta šķīdumu (NaHCO₃) ūdenī bez CO₂ (sk. 53. punktu) 0–20 mg/l apmērā kā neorganisko oglekli. Nātrija hidroksīda šķīdumu (7M, 21. punkts) (piemēram, 1 ml pievieno 107 ml barotnes) injicē caur katras paraugiem izmantotās pudeles aizbāzni, un pudeles vienu stundu krata testēšanas temperatūrā. Jāizmanto tāds pats NaOH šķīdums visās pudelēs, no kurām ņem paraugus un pēc tam atbrīvojas konkrētajā dienā, bet nav obligāti jāizmanto tāds pats šķīdums visos paraugu ņemšanas gadījumos testēšanas laikā. Ja ir vajadzīgas absolūtās neorganiskā oglekļa vērtības no tukšajām pudelēm visos paraugu ņemšanas gadījumos, katru reizi, kad izmantos NaOH šķīdumu, būs jānosaka tā neorganiskais ogleklis. Pudeles izņem no kratītāja un ļauj nogulsnēties. Ar šļirci no katra trauka šķidrās fāzes iegūst piemērotus daudzumus (piemēram, 50–1 000 µl). Paraugus injicē neorganiskā oglekļa analizatorā un reģistrē neorganiskā oglekļa koncentrācijas. Jānodrošina, ka izmantotais analizators ir pienācīgi aprīkots, lai tas varētu analizēt ar šo metodi iegūtos alkalīna paraugus.
56. Šīs metodes princips ir tāds, ka pēc sārmu pievienošanas un kratīšanas neorganiskā oglekļa koncentrācija brīvajā tilpumā ir niecīga. Tas attiecībā uz testēšanas sistēmu ir jāpārbauda vismaz vienu reizi, izmantojot neorganiskā oglekļa standartus, pievienojot sārmus un ļaujot nogulsnēties, un pēc tam izmērot neorganiskā oglekļa koncentrāciju gan brīvajā tilpumā, gan šķidrās fāzē (sk. 53. punktu). Koncentrācijai brīvajā tilpumā ir jābūt tuvu nulles vērtībai. Šī pārbaude par gandrīz pilnīgu CO₂ absorbciju nav jāveic katrā testēšanas reizē.
57. Ja ir jānosaka DOC noārdīšanās (tikai ūdenī šķīstošām testējamām ķīmiskajām vielām), paraugi jāņem no šķidrās fāzes no atsevišķām pudelēm (kas nesatur sārmus), jāfiltrē cauri membrānai un jāinjicē DOC analizatorā. Šīs pudeles pēc vajadzības var izmantot citām analīzēm, lai noteiktu primāro bionoārdīšanos.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu aprēķināšana

58. Pieņemot 100 % testējamās ķīmiskās vielas mineralizāciju CO_2 , ThIC , kas pārsniedz tukšajās kontroles pudelēs radīto, atbilst TOC , kurš pievienots katrā testēšanas pudelē testa sākumā, t. i.:

$$\text{ThIC} = \text{TOC}.$$

Neorganiskā oglekļa (TIC) kopējā masa (mg) katrā pudelē ir:

$$\text{TIC} = (\text{mg oglekļa šķīdumā} + \text{mg oglekļa brīvajā tilpumā}) = (V_L \times C_L) + (V_H \times C_H) \quad 1. \text{ vienādojums}$$

kur:

V_L = šķīduma tilpums pudelē (litri);

C_L = neorganiskā oglekļa koncentrācija šķīdumā (mg/l kā ogleklis);

V_H = brīvais tilpums (litri);

C_H = neorganiskā oglekļa koncentrācija brīvajā tilpumā (mg/l kā ogleklis).

Turpmāk 60. un 61. punktā ir aprakstīti TIC aprēķini divām analītiskajām metodēm, ko izmanto neorganiskā oglekļa mērīšanai šajā testā. Bionoārdīšanās īpatsvaru (% D) katrā gadījumā aprēķina šādi:

$$\%D = \frac{(\text{TIC}_t - \text{TIC}_b)}{\text{TOC}} \times 100 \quad 2. \text{ vienādojums}$$

kur:

TIC_t = mg TIC testēšanas pudelē laikā t ;

TIC_b = vidējais mg TIC tukšajās pudelēs laikā t ;

TOC = mg TOC , kas sākotnēji pievienots testēšanas pudelē.

Bionoārdīšanās īpatsvaru (% D) aprēķina testēšanas (F_T), standartvielas (F_C) un, ja ir ietverta inhibēšanas uzraudzība, kontroles (F_I) pudelēm no attiecīgajiem TIC daudzumiem, kas izveidojušies līdz katrai paraugu ņemšanas reizei.

59. Ja TIC saturs sterilajās kontroles pudelēs (F_S) ir būtiski palielinājies testēšanas laikā, var secināt, ka ir notikusi testējamās ķīmiskās vielas abiotiska noārdīšanās, un tas ir jāņem vērā, aprēķinot D pēc 2. vienādojuma.

Paskābināšana līdz $\text{pH} < 3$ apmērā

60. Tā kā paskābināšana līdz $\text{pH} < 3$ apmērā un līdzsvarošana izlīdzina TIC koncentrāciju šķīdrajā un gāzes fāzē, ir jāmēra tikai neorganiskā oglekļa koncentrācija gāzes fāzē. Tādējādi saskaņā ar 1. vienādojumu $\text{TIC} = (V_L + V_H) \times C_H = V_B \times C_H$, kur V_B serumā pudeles tilpums.

CO₂ pārvēršana karbonātā

61. Saskaņā ar šo metodi aprēķinus veic pēc 1. vienādojuma, bet ignorē niecīgo neorganiskā oglekļa daudzumu gāzes fāzē, proti, $V_H \times C_H = 0$ un $TIC = V_L \times C_L$.

Rezultātu izteikšana

62. Bionoārdīšanās likni iegūst, grafiski attēlojot bionoārdīšanās (D) īpatsvaru attiecībā pret inkubēšanas laiku, un, ja iespējams, norāda kavējuma fāzi, bionoārdīšanās fāzi, 10 dienu laikposmu un plato fāzi, kas ir fāze, kurā ir sasniegta maksimālā noārdīšanās un kurā bionoārdīšanās likne ir izlīdzinājusies. Ja ir iegūti salīdzināmi rezultāti paralēliem testēšanas traukiem F_T (< 20 % starpība), grafiski attēlo vidējo likni (sk. 2. papildinājuma 1. attēlu). Ja nav iegūti, liknes attēlo grafiski katram traukam atsevišķi. Nosaka bionoārdīšanās īpatsvara vidējo vērtību plato fāzē vai novērtē augstāko vērtību (piemēram, ja likne plato fāzē samazinās), bet ir svarīgi novērtēt, ka otrajā gadījumā vērtība nav "ārpus robežām". Šo bionoārdīšanās maksimālo līmeni kā "testējamās ķīmiskās vielas bionoārdīšanās pakāpi" norāda testēšanas pārskatā. Ja testēšanas trauku skaits bija nepietiekams, lai norādītu plato fāzi, vidējās vērtības aprēķināšanai izmanto pēdējā testēšanas dienā izmērītos datus. Ar šo pēdējo vērtību, kas ir piecu atkārtojumu vidējais lielums, norāda precizitāti, ar kādu ir noteikts bionoārdīšanās īpatsvars. Tāpat pārskatā ir jānorāda vērtība, kas iegūta 10 dienu laikposma beigās.

63. Tāpat grafiski attēlo ķīmiskās standartvielas (F_C) likni un, ja tas ir ietverts, abiotiskās noārdīšanās pārbaudes (F_S) un inhibējošas ietekmes kontroles (F_I) likni.

64. Reģistrē tukšajās kontroles pudelēs (F_B), kā arī pudelēs F_S (abiotiska pārbaude), ja šīs pudeles ir ietvertas testā, esošos TIC daudzumus.

65. Aprēķina F_I trauku D, pamatojoties uz teorētisko radīto neorganisko oglekli, ko prognozē vienīgi no standartastāvdaļas maisījumā. Ja 28. dienā $[(D_{FC}^{(1)} - D_{FI}^{(2)}) / D_{FC}] \times 100 > 25 \%$, var pieņemt, ka testējamā ķīmiskā viela inhibēja sējmateriāla darbību, un uz to var attiecināt D_{FI} zemās vērtības, kas iegūtas testēšanas apstākļos. Tādā gadījumā testēšanu varētu atkārtot, izmantojot zemāku testēšanas koncentrāciju un, vēlams, samazinot DIC sējmateriālā, kā arī samazinot TIC tukšajās kontroles pudelēs, jo pretējā gadījumā zemāka koncentrācija samazinās metodes precizitāti. Var arī izmantot citu sējmateriālu. Ja pudelē F_S (abiotiska pārbaude) ir novērots TIC daudzuma būtisks samazinājums (> 10 %), var būt notikuši abiotiski noārdīšanās procesi.

Rezultātu derīgums

66. Testu uzskata par derīgu, ja:

- a) vidējais noārdīšanās īpatsvars traukos F_C , kas satur ķīmisko standartvielu, ir > 60 % 14. inkubācijas dienā; un
- b) vidējais TIC daudzums tukšajās kontroles pudelēs F_B testēšanas beigās ir > 3 mg C/l.

Ja nav atbilstības šiem ierobežojumiem, testēšana ir jāatkārto ar sējmateriālu no cita avota un/vai ir jāpārskata procedūras. Piemēram, ja problēmu rada liela daudzuma neorganiskā oglekļa veidošanās tukšajās pudelēs, jāpiemēro 27.–32. punktā aprakstītā procedūra.

67. Ja testējamā ķīmiskā viela nesasniedz 60 % *ThIC* un ja tika pierādīts, ka tā nav inhibējoša (65. punkts), testēšanu varētu atkārtot ar sējmateriāla lielāku koncentrāciju (līdz 30 mg/l aktīvo dūņu un 100 ml attīrīta notekūdens/l) vai ar sējmateriālu no citiem avotiem, it sevišķi, ja noārdīšanās bija 20–60 % diapazonā.

Rezultātu interpretācija

68. Bionoārdīšanās > 60 % *ThIC* apmērā 10 dienu laikposmā šajā testā parāda, ka testējamā ķīmiskā viela ir viegli bionoārdāma aerobos apstākļos.

69. Ja netiek sasniegta derīgumam vajadzīgā 60 % *ThIC* vērtība, jānosaka pH vērtība barotnē pudelēs, kurās nav pievienota ne skābe, ne sārmis. Vērtība zem 6,5 varētu norādīt uz nitrificēšanos. Tādā gadījumā testēšana ir jāatkārto ar augstākas koncentrācijas buferšķīdumu.

⁽¹⁾ Noārdīšanās īpatsvars traukos F_C , kas satur standartvielu.

⁽²⁾ Noārdīšanās īpatsvars traukos F_I .

Testēšanas pārskats

70. Jāsaprot tabula ar % D vērtībām katrai testēšanas (F_T), standartvielas (F_C) un, ja tā ietverta, inhibēšanas kontroles pudelei (F_I) par katru dienu, kad ņemti paraugi. Ja atkārtojumu pudelēm tiek iegūti salīdzināmi rezultāti, ir grafiski jāattēlo vidējā % D attiecībā pret laiku. Jāreģistrē TIC daudzums tukšajās pudelēs (F_B) un sterilajās kontroles pudelēs (F_S), kā arī jāreģistrē DOC un/vai citas vērtības un to noārdīšanās īpatsvars.
71. Jānosaka % D vidējā vērtība plato fāzē vai jāizmanto augstākā vērtība, ja bionoārdīšanās līkne plato fāzē samazinās, un pārskatā tas jānorāda kā "testējamās ķīmiskās vielas bionoārdīšanās pakāpe". Ja izmanto augstāko vērtību, ir svarīgi nodrošināt, lai tā nebūtu "ārpus robežām".
72. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela

- vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums, CAS numurs, struktūrformula un attiecīgās fizikālās un ķīmiskās īpašības,
- testējamās vielas tīrība (piemaisījumi).

Testēšanas apstākļi:

- atsauce uz šo testēšanas metodi,
- izmantotās testēšanas sistēmas apraksts (piemēram, trauka tilpums, brīvā tilpuma un šķidruma tilpuma attiecība, maisīšanas metode utt.),
- testējamās ķīmiskās vielas un ķīmiskās standartvielas pievienošana testēšanas sistēmai: testēšanā izmantotā koncentrācija un oglekļa daudzums, kas devās ievadīts katrā testēšanas pudelē, šķīdumu izmantošana,
- sīkas ziņas par izmantoto sējmateriālu, jebkādu iepriekšēju apstrādi un iepriekšēju kondicionēšanu,
- inkubācijas temperatūra,
- neorganiskā oglekļa analīzes principa validācija,
- neorganiskā oglekļa analizatora galvenie raksturlielumi (un jebkādas citas izmantotās analītiskās metodes),
- atkārtojumu skaits.

Rezultāti:

- bionoārdīšanās izejas dati un aprēķinātās vērtības tabulas veidā,
- grafiks ar noārdīšanās īpatsvaru attiecībā pret laiku gan testējamajai ķīmiskajai vielai, gan ķīmiskajai standartvielai, kavējuma fāze, noārdīšanas fāze, 10 dienu laikposms un slīpums,
- noārdīšanās īpatsvars plato fāzē, testēšanas beigās un pēc 10 dienu laikposma,
- ikvienas testa rezultātu nepieņemšanas iemesls,
- jebkādi citi fakti, kas ir būtiski attiecībā uz piemēroto procedūru,
- rezultātu apspriešana.

LITERATŪRA

- (1) Šā pielikuma C.4. nodaļa "Vieglas bioloģiskās noārdīšanās spējas noteikšana" – "CO₂ izdalīšanās tests (C.4.-C metode)".
- (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, Mazzocchi 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.
- (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) Šā pielikuma C.4. nodaļa "Viegļas bioloģiskās noārdīšanās spējas noteikšana".
- (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) Šā pielikuma C.11. nodaļa "Aktīvo dūņu respirācijas inhibīcijas tests".
- (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.
-

1. papildinājums

SAĪSINĀJUMI UN DEFINĪCIJAS

IC: neorganiskais ogleklis.

ThCO₂: teorētiskais oglekļa dioksīds (mg) ir aprēķinātais oglekļa dioksīda daudzums, kuram jāveidojas no zināma vai izmērīta oglekļa daudzuma, kas ir testējamās ķīmiskās vielas sastāvā, to pilnībā mineralizējot; izsaka arī miligramos oglekļa dioksīda, kas izdalās uz miligramu testējamās ķīmiskās vielas.

DOC: izšķīdušais organiskais ogleklis ir šķīdumā esošais organiskais ogleklis vai organiskais ogleklis, kas iziet cauri 0,45 mikrometru filtram vai paliek dzidrā šķīdumā pēc 15 minūšu centrifugēšanas aptuveni 4 000 g apmērā (apm. 40 000 m/s²).

DIC: izšķīdušais neorganiskais ogleklis.

ThIC: teorētiskais neorganiskais ogleklis.

TIC: kopējais neorganiskais ogleklis.

Viegli bionoārdāmas: tādu ķīmisko vielu pieņemta klasifikācija, kas izturējušas konkrētus skrīninga testus attiecībā uz pilnīgu bionoārdīšanos; šie testi ir tik stingri, ka var pieņemt, ka šādas ķīmiskās vielas aerobos apstākļos ūdens vidē noārdīsies ātri un pilnībā.

10 dienu laikposms: 10 dienas tieši pēc 10 % bionoārdīšanās sasniegšanas.

Potenciāla bionoārdīšanās spēja: tādu ķīmisko vielu klasifikācija, par kurām jebkādā bionoārdīšanās testā ir iegūtas neapšaubāmas liecības par to (primārās vai galīgās) bionoārdīšanās spēju.

Pilnīga aeroba bionoārdīšanās: noārdīšanās līmenis, kas tiek sasniegts, kad testējamo ķīmisko vielu pilnībā izmanto mikroorganismi, rezultātā izdalot oglekļa dioksīdu, ūdeni, minerālsāļus un jaunas mikroorganismu šūnu sastāvdaļas (biomasu).

Mineralizācija: organisko ķīmisko vielu pilnīga noārdīšana līdz CO₂ un H₂O aerobos apstākļos un līdz CH₄, CO₂ un H₂O anaerobos apstākļos.

Kavējuma fāze: laiks no testēšanas sākuma, līdz ir sasniegta noārdošo mikroorganismu aklimatizācija un/vai adaptācija un līdz testējamās ķīmiskās vielas vai organiskās vielas bionoārdīšanās pakāpe ir paaugstinājusies līdz nosakāmam līmenim (piemēram, 10 % no maksimālās teorētiskās bionoārdīšanās vai mazāk atkarībā no mērīšanas paņēmiena precizitātes).

Noārdīšanās fāze: laiks no kavējuma perioda beigām līdz laikam, kad tiek sasniegti 90 % no noārdīšanās maksimālā līmeņa.

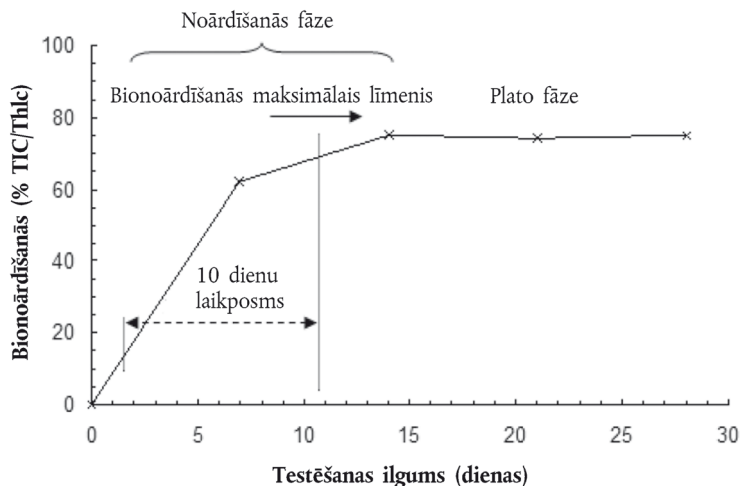
Plato fāze: fāze, kurā ir sasniegta maksimālā noārdīšanās un bionoārdīšanās līkne ir izlīdzinājusies.

Testējamā ķīmiskā viela: jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

2. papildinājums

Bionoārdīšanās līknes piemērs

1. attēls

1-oktanola bionoārdīšanās CO₂ brīvā tilpuma testā

Glosārijs

Bionoārdīšanās:

Noārdīšanās fāze:

Bionoārdīšanās maksimālais līmenis:

Plato fāze:

10 dienu laikposms:

Testēšanas ilgums (dienas):

C.30. BIOAKUMULĀCIJA SAUSZEMES MAZSARTĀRPOS (*OLIGOCHAETA*)

IEVADS

- Šī testēšanas metode ir līdzvērtīga ESAO Testēšanas norādījumiem (turpmāk – TG) 317 (2010. gads). Starp citām testēšanas metodēm, kas attiecas uz sadalīšanos vidē, 1996. gadā publicēja "Biokoncentrācija – caurplūdes tests ar zivīm" (šā pielikuma C.13. nodaļa (49)), savukārt 2008. gadā publicēja "Bioakumulācija nosēdumos dzīvojošajos bentiskajos mazzsartārpēs (*Oligochaetes*)" (53). Ir grūti un reizēm neiespējami ekstrapolēt ūdens bioakumulācijas datus attiecībā uz sauszemes organismiem, piemēram, sliekām. Pašlaik izmanto aprēķinu modeļus, kuru pamatā ir testējamās ķīmiskās vielas lipofilitāte, piemēram, atsauce (14) un (37), lai novērtētu ķīmisko vielu bioakumulāciju augsnē, piemēram, ES tehniskās pamatnostādnes (19). Nepieciešamība pēc konkrētajai jomai piemērotas testēšanas metodes jau ir risināta, piemēram, atsaucē (55). Šāda metode ir sevišķi svarīga, lai sauszemes pārtikas ķēdēs novērtētu sekundāro saindēšanos (4). Vairākās valsts līmeņa testēšanas metodēs bija pievērsta uzmanība bioakumulācijas jautājumam organismos, kas nav zivis, piemēram, atsauce (2) un (72). Amerikas Testēšanas un materiālu biedrība (turpmāk – ASTM) ir izstrādājusi metodi piesārņotas augsnes izraisītas bioakumulācijas mērīšanai sliekās (*Eisenia fetida*, Savigny) un baltajos tārpos (3). Starptautiski pieņemta metode bioakumulācijas noteikšanai piesātinātā augsnē uzlabos ķīmisko vielu riska novērtējumu sauszemes ekosistēmās, piemēram, atsauce (25) un (29).
- Augsnī uzņemto bezmugurkaulnieku ir pakļauti ar augsni saistīto ķīmisko vielu iedarbībai. Starp šiem dzīvniekiem būtiska nozīme augsņu struktūrā un funkcionēšanā ir sauszemes mazzsartārpēm (*oligochaeta*) (15) (20). Sauszemes mazzsartārpi dzīvo augsnē un daļēji augsnes virskārtā (it sevišķi zemsegā). Tie nereti ir vispārstāvētākās sugas biomasas izteiksmē (54). Tā kā šie dzīvnieki nodrošina augsnes bioturbāciju un ir citu dzīvnieku barība, tiem var būt spēcīga ietekme uz ķīmisko vielu bioloģisko pieejamību citiem organismiem, piemēram, plēsīgiem bezmugurkaulniekiem (piemēram, plēsīgām ērcēm un vabolēm (64)) vai mugurkaulniekiem (piemēram, lapsām un kaijām (18) (62)). Dažas no zemes mazzsartārpu sugām, ko pašlaik izmanto ekotoksikoloģijas testos, ir aprakstītas 5. papildinājumā.

3. ASTM sagatavotajā *Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm Eisenia fetida and the Enchytraeid Potworm Enchytraeus albidus* (3) ir sniegti daudzi būtiski un lietderīgi dati par šīs augsnes bioakumulācijas testēšanas metodes īstenošanu. Tāpat šajā testēšanas metodē atsaucas uz tādiem dokumentiem kā šā pielikuma C.13. nodaļa "Biokoncentrācija – caurplūdes tests ar zivīm" (49) un ESAO TG 315 "Bioakumulācija nosēdumos dzīvojošajos bentiskajos mazzsartārpos (*Oligochaetes*)" (53). Turklāt šajā testēšanas metodē būtisku informāciju ir nodrošinājusi praktiskā pieredze, kas iegūta un aprakstīta augsnes bioakumulācijas pētījumos un publikācijās literatūrā, piemēram, atsauce (1) (5) (11) (12) (28) (40) (43) (45) (57) (59) (76) (78) un (79).
4. Šī testēšanas metode ir galvenokārt piemērojama stabilām, neitrālām organiskajām ķīmiskajām vielām, kam ir tendence adsorbēties uz augsnēm. Tāpat ar šo testēšanas metodi var būt iespējams testēt bioakumulāciju ar augsni saistītos stabilos metālorganiskos savienojumos. Turklāt tā ir piemērojama metāliem un citiem mikroelementiem.

PRIEKŠNOTEIKUMS

5. Testi ķīmiskās vielas bioakumulācijas noteikšanai sauszemes mazzsartārpos ir veikti ar smagajiem metāliem (sk., piemēram, atsaucei (63)) un noturīgām organiskajām ķīmiskajām vielām, kuru $\log K_{ow}$ vērtības ir 3–6 diapazonā, piemēram, atsauce (40). Šādus testus piemēro:
 - ķīmiskajām vielām, kuru $\log K_{ow}$ ir virs 6 (ļoti hidroforas ķīmiskās vielas),
 - ķīmiskajām vielām, kas ietilpst tādu organisko ķīmisko vielu kategorijā, par kurām ir zināms, ka tās spēj bioakumulēties dzīvos organismos, piemēram, virsmaktīvas ķīmiskās vielas vai ķīmiskās vielas ar augstu adsorbēšanas spēju,
 - ķīmiskajām vielām, kuru struktūras iezīmes liecina par bioakumulācijas spēju, piemēram, tādu ķīmisko vielu analogi, kam ir zināma bioakumulācijas spēja,
 - metāliem.
6. Pirms sāk pētījumu, par testējamo ķīmisko vielu ir jāiegūst tāda informācija kā vispārpieņemtais nosaukums, ķīmiskais nosaukums (vēlams, IUPAC nosaukums), struktūrformula, CAS reģistrācijas numurs, tīrība, drošības pasākumi, atbilstīgi glabāšanas apstākļi un analītiskās metodes. Turklāt jābūt zināmai šādai informācijai:
 - a) šķīdība ūdenī;
 - b) oktanola un ūdens sadalīšanās koeficients (K_{ow});
 - c) augsnes un ūdens sadalīšanās koeficients, kas izteikts kā K_{oc} ;
 - d) tvaika spiediens;
 - e) noārdīšanās spēja (piemēram, augsnē, ūdenī);
 - f) zināmie metabolīti.
7. Var izmantot radioaktīvi marķētas un nemarkētas testējamās ķīmiskās vielas. Tomēr, lai būtu vieglāk veikt analīzi, ir ieteicams izmantot radioaktīvi marķētu testējamo ķīmisko vielu. Lēmumu pieņem, pamatojoties uz noteikšanas robežām vai prasību noteikt testējamo ķīmisko pamatvielu un metabolītus. Ja izmanto radioaktīvi marķētu testējamo ķīmisko vielu un ja tiek noteiktas kopējās radioaktīvās atliekas, ir svarīgi radioaktīvi marķētās atliekas gan augsnē, gan testēšanas organismos raksturot, nosakot testējamās ķīmiskās pamatvielas un marķētās vielas, kas nav pamatviela, īpatsvarus, piemēram, paraugos, kuri paņemti stabilā stāvoklī vai uzņemšanas fāzes beigās, lai būtu iespējams aprēķināt bioakumulācijas koeficientu (turpmāk – BAF) testējamai ķīmiskajai pamatvielai un attiecīgajiem augsnes metabolītiem (sk. 50. punktu). Var nākties grozīt šeit aprakstīto metodi, piemēram, nodrošināt pietiekamu biomasu, lai noteiktu radioaktīvi nemarkētu organisku testējamo ķīmisko vielu vai metālus. Ja nosaka kopējās radioaktīvās atliekas (ar šķīdumu scintilācijas skaitīšanu pēc ekstrakcijas, dedzināšanas vai audu solubilizēšanas), bioakumulācijas koeficienta pamatā ir testējamā ķīmiskā pamatviela un metabolīti. BAF aprēķinu ieteicams pamatot uz testējamās ķīmiskās pamatvielas koncentrāciju organismos un uz kopējām radioaktīvajām atliekām. Pēc tam no BAF ir jāaprēķina biocenozes un augsnes akumulācijas koeficients (turpmāk – BSAF), kas normalizēts attiecībā uz augsnes tārpā tauku saturu un organiskā oglekļa saturu, lai nodrošinātu salīdzināmību starp dažādu bioakumulācijas testu rezultātiem.

8. Jābūt zināmai testējamās ķīmiskās vielas toksicitātei sugām, ko izmanto testēšanā, piemēram, ietekmes koncentrācijai (EC_{50}) vai letālai koncentrācijai (LC_{50}) uzņemšanas fāzes laikā (piemēram, atsaucē (19)). Testējamās ķīmiskās vielas izraudzītajai koncentrācijai vēlams būt aptuveni 1 % apmērā no tās akūtās asimptotiskās LC_{50} un vismaz 10 reizes augstākai par tās noteikšanas robežu augsnē ar izmantoto analītisko metodi. Ja pieejamas, jāizvēlas toksicitātes vērtības, kas iegūtas ilgtermiņa pētījumos par subletāliem mērķparametriem (51) (52). Ja šādi dati nav pieejami, akūtās toksicitātes testēšana nodrošinās lietderīgu informāciju (sk., piemēram, atsauci (23)).
9. Jābūt pieejamai atbilstīgai analītiskajai metodei ar zināmu precizitāti, pareizību un jutīgumu, lai varētu kvantificēt ķīmisko vielu testēšanas šķīdumos, augsnē un bioloģiskajā materiālā, kā arī jābūt pieejamiem datiem par paraugu sagatavošanu un glabāšanu un materiālu drošības datu lapām. Jābūt zināmām arī testējamās vielas analītiskās noteikšanas robežām augsnē un tārpā. Ja izmanto ar ^{14}C marķētu testējamo ķīmisko vielu, jābūt zināmai īpatnējai radioaktivitātei (t. i., $Bq\ mol^{-1}$) un ar piemaisījumiem saistītās radioaktivitātes īpatsvaram. Testējamās ķīmiskās vielas īpatnējai radioaktivitātei jābūt pietiekami augstai, lai atvieglotu analīzi, un izmantotās testēšanas koncentrācijas nedrīkstētu izsaukt toksisku ietekmi.
10. Testēšanu var veikt ar mākslīgu augsni vai ar dabīgām augsnēm. Pirms testa sākšanas jābūt zināmai informācijai par izmantotās dabīgās augsnes raksturlielumiem, tādiem kā augsnes vai tās sastāvdaļu izcelsme, pH, organiskā oglekļa saturs, daļiņu lieluma sadalījums (smilšu, sāņu un mālu īpatsvars) un ūdens saturēšanas spēja (turpmāk – WHC) (3) (48).

TESTĒŠANAS PRINCIPS

11. Testējamās ķīmiskās vielas bioakumulāciju raksturo tādi parametri kā bioakumulācijas koeficients (turpmāk – BAF), uzņemšanas ātruma konstante (k_s) un noārdīšanās ātruma konstante (k_d). Definīcijas ir sniegtas 1. papildinājumā.
12. Testam ir divas fāzes, proti, uzņemšanas (eksponēšanas) fāze un noārdīšanās (pēceksponēšanas) fāze. Uzņemšanas fāzē tārpā atkārtotumu grupas pakļauj ar testējamo ķīmisko vielu piesātinātās augsnes iedarbībai. Papildus testēšanas dzīvniekiem identiskos apstākļos – tikai bez testējamās ķīmiskās vielas – tur kontroles tārpā grupas. Nosaka testēšanas organismu saussvaru un tauku saturu. To var paveikt, izmantojot kontroles grupas tārpus. Analītiskās pamatvērtības (tukšie testi) var iegūt, analizējot kontroles tārpā un augsnes paraugus. Noārdīšanās fāzē tārpus pārvieto uz augsni, kurā nav testējamās ķīmiskās vielas. Noārdīšanās fāze ir vajadzīga vienmēr, izņemot gadījumus, ja testējamās ķīmiskās vielas uzņemšana eksponēšanas fāzē ir bijusi nebūtiska. Noārdīšanās fāze nodrošina informāciju par ātrumu, kādā testēšanas organismi izvada testējamo ķīmisko vielu (piemēram, atsaucē (27)). Ja uzņemšanas fāzē nav sasniegts stabils stāvoklis, kinētiskos parametrus, t. i., kinētiskās bioakumulācijas koeficientu (turpmāk – BAF_k) un uzņemšanas un noārdīšanās ātruma konstanti(-es), ieteicams pamatot uz uzņemšanas un noārdīšanās fāžu rezultātu vienlaicīgu piemērošanu. Testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju tārpā/uz tārpā uzrauga abās testēšanas fāzēs.
13. Uzņemšanas fāzē veic mērījumus paraugu ņemšanas laikos līdz 14 dienām (enhitēdijām) vai 21 dienai (sliekām), līdz ir sasniegts stabils stāvoklis (11) (12) (67). Stabils stāvoklis iestājas, kad koncentrācijas tārpā grafiskais attēlojums attiecībā pret laiku ir paralēls attiecībā pret laika asi un kad trīs secīgas koncentrācijas analīzes, ko veica paraugiem, kuri ņemti vismaz divu dienu intervālos, cita no citas neatšķiras vairāk kā par $\pm 20\%$, pamatojoties uz statistiskiem salīdzinājumiem (piemēram, mainības analīzi, regresijas analīzi).
14. Noārdīšanās fāzi veido testēšanas organismu pārvietošana uz traukiem, kas satur to pašu substrātu bez testējamās ķīmiskās vielas. Noārdīšanās fāzē mērījumus veic paraugu ņemšanas laikos 14 dienu laikā (enhitēdijām) vai 21 dienas laikā (sliekām), ja vien agrāk veikti analītiskie mērījumi neuzrādīja testējamās ķīmiskās vielas atlieku 90 % noārdīšanos tārpā. Testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju tārpā noārdīšanās fāzes beigās reģistrē kā nenoārdījušās atliekas. Stabila stāvokļa bioakumulācijas koeficientu (turpmāk – BAF_{ss}) vēlams aprēķināt gan kā koncentrācijas attiecību tārpā (C_a) un augsnē (C_s) šķietami stabilā stāvoklī, gan kā BAF_k kā uzņemšanas ātruma no augsnes konstantes (k_s) un noārdīšanās ātruma konstantes (k_d) attiecību (saistībā ar definīcijām sk. 1. papildinājumu), pieņemot pirmās kārtas kinētiku (saistībā ar aprēķiniem sk. 2. papildinājumu). Ja pirmās kārtas kinētika noteikti nav piemērojama, jāizmanto citas metodes.
15. Uzņemšanas ātruma konstanti, noārdīšanās ātruma konstanti (vai konstantes, ja ir iesaistīti citi modeļi), BAF_k un attiecīgā gadījumā katra minētā parametra ticamības robežas aprēķina no datorizētiem vienādojumu modeļiem (norādē sk. 2. papildinājumu). Katra modeļa piemērotību var noteikt, piemēram, no korelācijas koeficienta vai noteikšanas koeficienta (koeficienti, kuru vērtība ir tuvu 1, ir labi piemēroti), vai H^2 kvadrāta koeficienta. Tāpat standarta kļūdas vai ticamības robežas apmērs saistībā ar aplēstajiem parametriem var norādīt uz modeļa piemērotību.
16. Lai samazinātu tādu testēšanas rezultātu mainību, kas veikti ar testējamām ķīmiskajām vielām ar augstu lipofilitāti, bioakumulācijas koeficienti ir jāizsaka saistībā ar tauku saturu un organiskā oglekļa saturu (kg augsnes organiskā oglekļa uz kg tārpā tauku saturu). Šis pieejas pamatā ir tas, ka dažās ķīmisko vielu kategorijās pastāv skaidras attiecības starp bioakumulācijas spēju un lipofilitāti. Tas ir noteikts attiecībā uz zivīm (47).

Pastāv attiecības starp zivju tauku saturu un šādu ķīmisko vielu bioakumulāciju. Arī attiecībā uz bentiskajiem organismiem ir atklātas līdzīgas korelācijas, piemēram, atsaucē (30) un (44). Tāpat šāda korelācija ir pierādīta attiecībā uz sauszemes mazsartārpjiem, piemēram, atsaucē (5) (6) (7) un (14). Ja ir pieejams pietiekams daudzums tārpju audu, testēšanas dzīvnieku tauku saturu var noteikt tādā pašā bioloģiskajā materiālā, kādu izmantoja, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju. Lai noteiktu tauku saturu, var arī izmantot kontroles dzīvniekus.

TESTA DERĪGUMS

17. Lai tests būtu derīgs, gan kontroles, gan testēšanas grupām jānodrošina atbilstība šādiem kritērijiem:

- testēšanas beigās kopējā mirstība uzņemšanas un noārdīšanās fāzē nedrīkstētu pārsniegt 10 % (sliekām) vai 20 % (enhitreīdiem) no kopējā izmantoto tārpju skaita,
- *Eisenia fetida* un *Eisenia andrei* gadījumā vidējais masas zudums, ko nosaka uzņemšanas fāzes beigās un noārdīšanās fāzes beigās, nedrīkstētu pārsniegt 20 % salīdzinājumā ar sākotnējo svaigo svaru katras fāzes sākumā.

METODES APRAKSTS

Testēšanas sugas

18. Bioakumulācijas testēšanai ir ieteicamas vairākas sauszemes mazsartārpju sugas. Visbiežāk izmantotās sugas, proti, *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* (*Lumbricidae*), *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* un *Enchytraeus luxuriosus* (*Enchytraeidae*), ir aprakstītas 5. papildinājumā.

Iekārta

19. Jāpievērš vērība tam, lai visās iekārtas daļās izvēlētos izmantot materiālus, kas varētu izšķīdināt vai adsorbēt testējamo ķīmisko vielu vai ekstrahēt citas ķīmiskās vielas un kam varētu būt negatīva ietekme uz testēšanas dzīvniekiem. Var izmantot no ķīmiski inerta materiāla izgatavotus un noslodzei, t. i., testēšanas tārpju skaitam, piemērotas ietilpības standarta taisnstūra formas vai cilindriskus traukus. Aprīkojumam, kas nonāks saskarē ar testēšanas barotni, var izmantot nerūsējošu tēraudu, plastmasu vai stiklu. Testēšanas trauki ir atbilstīgi jāapsedz, lai novērstu tārpju izbēgšanu, bet vienlaikus nodrošinātu pietiekamu gaisa padevi. Ķīmiskajām vielām ar augstiem absorbcijas koeficientiem, piemēram, sintētiskajiem piretroīdiem, var būt vajadzīgs kvarca stikls. Tādos gadījumos aprīkojums pēc izmantošanas jāizmet (49). Jānovērš radioaktīvi marķētu testējamo vielu un gaistošu ķīmisko vielu iztvaikošana. Jāizmanto uztvērēji (piemēram, stikla gāzes mazgāšanas pudeles), kas satur piemērotus absorbentus, lai paturētu jebkādas atliekas, kuras iztvaiko no testēšanas traukiem.

Augsne

20. Testēšanas augsnes kvalitātei ir jānodrošina testēšanas organismu izdzīvošana un, vēlams, vairošanās aklimatizācijas un testēšanas periodos, šiem organismiem neuzrādot nekādas izskata vai darbības anomālijas. Tārpjiem ir jāierokas augsnē.
21. Par substrātu testēšanā ir ieteicams izmantot mākslīgo augsni, kas aprakstīta šā pielikuma C.8. nodaļā (48). Bioakumulācijas testēšanā izmantojamās mākslīgās augsnes sagatavošanas un glabāšanas ieteikumi ir sniegti 4. papildinājumā. Ar gaisu izžāvētu mākslīgo augsni līdz izmantošanai var uzglabāt istabas temperatūrā.
22. Tomēr arī dabīgas augsnes no nepiesārņotām vietām var izmantot kā testēšanas un/vai kultivēšanas augsni. Dabīgām augsnēm ir jānorāda vismaz izcelsme (savākšanas vieta), pH, organiskā oglekļa saturs, daļiņu lieluma sadalījums (smilšu, sanešu un mālu īpatsvars), maksimālā ūdens aiztures spēja (turpmāk – WHC_{max}) un mitruma saturs (3). Lietderīgu informāciju nodrošinās augsnes vai tās sastāvdaļu analīze pirms izmantošanas, lai noteiktu mikropiesārņotājus. Ja izmanto lauka augsni no lauku saimniecības, tā vismaz vienu gadu pirms parauga ņemšanas nedrīkst būt apstrādāta ar kultūraugu aizsardzības līdzekļiem vai ar tādu dzīvnieku mēslu mēslojumu, kuri ir saņēmuši kādus līdzekļus, un vismaz sešus mēnešus pirms parauga ņemšanas – ar organisku mēslojumu (50). Manipulācijas procedūras attiecībā uz dabīgām augsnēm pirms izmantošanas ekotoksikoloģijas testos ar mazsartārpjiem laboratorijās ir aprakstītas (3) atsaucē. Dabīgas augsnes laboratorijā jāuzglabā pēc iespējas īsāku laiku.

Testējamās ķīmiskās vielas ievadīšana

23. Testējamo ķīmisko vielu iejauc augsnē. Jāņem vērā testējamās ķīmiskās vielas fizikālās un ķīmiskās īpašības. Ūdenī šķīstošās testējamās ķīmiskās vielas ir pilnībā jāizšķīdina ūdenī pirms samaisīšanas ar augsni. Ieteicamā piesātināšanas procedūra ūdenī mazšķīstošu testējamo ķīmisko vielu gadījumā ietver vienas vai vairāku (mākslīgās) augsnes sastāvdaļu pārklāšanu ar testējamo ķīmisko vielu. Piemēram, kvarca smiltis vai to daļu var izmērcēt testējamās ķīmiskās vielas un piemērota organiskā šķīdinātāja šķīdumā, kas pēc tam lēnām iztvaiko

līdz sausam stāvoklim. Pēc tam pārklāto daļu var iemaisīt mitrā augsnē. Šīs procedūras lielākā priekšrocība ir tā, ka augsnē netiek iemaisīts šķīdinātājs. Ja izmanto dabīgu augsni, testējamo ķīmisko vielu var pievienot, piesātinot daļu testēšanas augsnes, kas izžāvēta ar gaisu, kā aprakstīts iepriekš attiecībā uz mākslīgo augsni, vai iemaisot testējamo ķīmisko vielu mitrā augsnē un pēc tam nodrošinot iztvaikošanu, ja izmanto šķīdinātāju vielu. Kopumā ir pēc iespējas jāizvairās no mitras augsnes saskaršanās ar šķīdinātājiem. Jāņem vērā šādi nosacījumi (3):

- ja izmanto šķīdinātāju, kas nav ūdens, tam jābūt ar ūdeni sajaucamam šķīdinātājam un/vai tādām, kuru var attīrīt (piemēram, iztvaicējot), augsnē atstājot tikai testējamo ķīmisko vielu,
 - ja izmanto šķīdinātāja kontroli, nav vajadzīga negatīva kontrole; šķīdinātāja kontrolē ir jāietver šķīdinātāja augstākā koncentrācija, kas pievienota augsnei, un jāizmanto šķīdinātājs no tās pašas sērijas, kuru izmantoja rezerves šķīduma sagatavošanai; šķīdinātāja toksicitātei un gaistamībai, kā arī testējamās ķīmiskās vielas šķīdībai izraudzītājā šķīdinātājā jābūt galvenajiem kritērijiem, ko piemēro, izvēloties piemērotu šķīdinātāju vielu.
24. Ķīmiskajām vielām, kas ir ūdenī un organiskajos šķīdinātājos mazšķīstošas, 2,0–2,5 g smalku kvarca smilšu uz katru testēšanas trauku var samaisīt ar testējamās ķīmiskās vielas daudzumu, piemēram, izmantojot miezeri vai piestu, lai iegūtu vēlamo testēšanas koncentrāciju. Šo kvarca smilšu un testējamās ķīmiskās vielas maisījumu pievieno iepriekš samitrinātai augsnei un rūpīgi samaisa ar atbilstīgu daudzumu dejonizēta ūdens, lai iegūtu vajadzīgo mitruma saturu. Galīgo maisījumu sadala pa testēšanas traukiem. Procedūru atkārto katrai testēšanas koncentrācijai, kā arī sagatavo atbilstīgu kontroles trauku ar 2,0–2,5 g smalku kvarca smilšu uz katru testēšanas trauku.
25. Ir jānosaka testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija augsnē pēc piesātināšanas. Pirms testēšanas organismu ielaišanas ir jāpārbauda testējamās ķīmiskās vielas homogēns sadalījums augsnē. Pārskatā jānorāda piesātināšanas metode un konkrētas piesātināšanas procedūras izvēles pamatojums (24).
26. Pirms ielaiž organismus, vēlams ļaut iestāties līdzsvaram starp augsni un porūdens fāzi. Ieteicamais laikposms ir četras dienas 20 °C temperatūrā. Daudzu ūdenī mazšķīstošu organisko ķīmisko vielu gadījumā laiks, kas vajadzīgs, lai sasniegtu patiesu līdzsvaru starp adsorbētajām un izšķīdušajām daļām, var būt vairākas dienas vai mēneši. Atkarībā no pētījuma mērķa, piemēram, kad ir jāimitē vides apstākļi, piesātināto augsni var "briedināt" ilgāku laikposmu, piemēram, metālu gadījumā tās būtu trīs nedēļas 20 °C temperatūrā (22).

Testēšanas organismu kultivēšana

27. Tārpus vēlams turēt pastāvīgā laboratorijas kultūrā. Norādījumi par laboratorijas kultivēšanas metodēm attiecībā uz *Eisenia fetida* un *Eisenia andrei*, kā arī enhitreīdu sugām ir sniegti 5. papildinājumā (sk. arī atsauci (48) (51) un (52)).
28. Testēšanā izmantotajiem tārpiem nedrīkst būt pamanāmu slimību, anomāliju un parazītu.

TESTĒŠANAS NORISE

29. Testēšanas organismus uzņemšanas fāzē pakļauj testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai. Uzņemšanas fāzei jāilgst 14 dienas (enhitreīdiem) vai 21 dienu (sliekām), ja vien nav pierādīts, ka ir sasniegts stabils stāvoklis.
30. Noārdīšanās fāzē tārpus pārvieto uz augsni, kurā nav testējamās ķīmiskās vielas. Pirmais paraugs jāņem 4–24 stundu laikā pēc noārdīšanās fāzes sākšanās. Paraugu ņemšanas grafiku piemēri 21 dienas uzņemšanas fāzei un 21 dienas noārdīšanās fāzei ir sniegti 3. papildinājumā.

Testēšanas organismi

31. Daudzām sauszemes enhitreīdu sugām atsevišķu īpatņu svars ir ļoti mazs (piemēram, 5–10 mg mitrais svars katram *Enchytraeus albidus* īpatnim un vēl mazāk *Enchytraeus crypticus* vai *Enchytraeus luxuriosus* īpatņiem). Lai noteiktu svaru un veiktu ķīmisko analīzi, var būt nepieciešams apvienot atkārtojuma testēšanas trauku tārpus (t. i., visus atkārtojuma trauka tārpus izmanto, lai iegūtu vienu analītisku audu rezultātu). Katram atkārtojumam pievieno 20 enhitreīdu īpatņus, un jāizmanto vismaz trīs atkārtojumi. Ja testējamās ķīmiskās vielas analītiskās noteikšanas robeža ir augsta, var būt vajadzīgs vairāk tārpu. Testēšanas sugām ar lielāku īpatņu svaru (*Eisenia fetida* un *Eisenia andrei*) var izmantot atkārtojuma traukus, kas satur vienu īpatni.
32. Testēšanā izmantotajām sliekām jābūt līdzīgam sveram (piemēram, *Eisenia fetida* un *Eisenia andrei* atsevišķu īpatņu sveram jābūt 250–600 mg). Enhitreīdu (piemēram, *Enchytraeus albidus*) garumam jābūt aptuveni 1 cm. Visiem konkrētā testā izmantotajiem tārpiem jābūt no viena avota un pieaugušiem dzīvniekiem ar jostīgu (sk. 5. papildinājumu). Tā kā dzīvnieka svars un vecums var ietekmēt BAF vērtības (piemēram, tauku satura un/vai

oliņu dēļ), šie parametri ir precīzi jāreģistrē un jāņem vērā, interpretējot rezultātus. Turklāt ekspozīcijas laikā var atbrīvoties no kokoniem, kas arī ietekmēs BAF vērtības. Pirms testēšanas ieteicams nosvērt testēšanas tārpu apakšparaugu, lai noteiktu vidējo mitro svaru un saussvaru.

33. Jāizmanto augsta augsnes un tārpu attiecība, lai pēc iespējas samazinātu testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas samazināšanos augsnē uzņemšanas fāzē. Katrā testēšanas traukā *Eisenia fetida* un *Eisenia andrei* gadījumā ieteicamais minimālais daudzums ir 50 g saussvara augsnes uz tārpu, savukārt enhitreīdu gadījumā ieteicamais minimālais daudzums ir 10–20 g saussvara augsnes uz tārpu. Traukiem jāsaturs 2–3 cm (enhitreīdiem) vai 4–5 cm (sliekām) dziļš augsnes slānis.
34. Testēšanā izmantotos tārpus izņem no kultūras (piemēram, enhitreīdus izņem ar juveliera pinceti). Pieaugušos dzīvniekus pārvieto uz neapstrādātu testēšanas augsni aklimatizācijai un baro (sk. 36. punktu). Ja testēšanas apstākļi atšķiras no kultūras apstākļiem, tārpu adaptācijai testēšanas apstākļiem jāpietiek ar 24–72 h aklimatizācijas fāzi. Pēc aklimatizācijas sliekas noskalo, tās ievietojot stikla traukos (piemēram, Petri traukos) ar tīru ūdeni, un nosver pirms ielaišanas testēšanas augsnē. Pirms nosvēršanas ir jāatbrīvojas no liekā ūdens uz tārpiem, tos uzmanīgi piespiežot pie trauka malas vai nosusinot ar nedaudz samitrinātu papīra dvieli.
35. Jānovēro un jāreģistrē testēšanas organismu ierakšanās tendences augsnē. Testos ar sliekām (kontroles un apstrādes grupu) dzīvnieki parasti ierokas augsnē dažu stundu laikā. Tas ir jāpārbauda ne vēlāk kā pēc 24 h pēc tārpu ielaišanas testēšanas traukos. Ja sliekas neierokas augsnē (piemēram, pāri 10 % vairāk nekā pusē no uzņemšanas fāzes laika), tas norāda, ka vai nu testēšanas apstākļi nav piemēroti, vai testēšanas organismi nav veselīgi. Tādā gadījumā testēšana jāpārtrauc un jāatkārto. Enhitreīdi galvenokārt dzīvo augsnes starpporās, un nereti to ārējais apvalks var tikai daļēji saskarties ar apkārtējo substrātu. Ierakušos un neierakušos enhitreīdu ekspozīciju pieņem par vienlīdzīgu, un enhitreīdu neierakšanās ne vienmēr nozīmē, ka tests ir jāatkārto.

Barošana

36. Barošana ir jāparedz gadījumā, ja izmanto augsni ar zemu kopējo organiskā oglekļa saturu. Ja izmanto mākslīgu augsni, ir ieteicama nedēļas barošana (t. i., tārpi jābaro reizi nedēļā) 7 mg sausu mēslu uz gramu sausas augsnes apmērā sliekām un nedēļas barošana 2–2,5 mg maltu auzu pārslu uz gramu sausas augsnes apmērā enhitreīdiem (11). Pirmā barības deva ir jāsamaisa ar augsni tieši pirms testēšanas organismu ielaišanas. Vēlams izmantot tādu pašu barības veidu, kādu izmantoja kultivēšanā (sk. 5. papildinājumu).

Gaisma un temperatūra

37. Testēšana jāveic kontrolēta apgaismojuma ciklā ar 16/8 stundu gaismas (vēlams, 400–800 luksi)/tumsas ciklu testēšanas trauku telpā (3). Testēšanas temperatūrai jābūt 20 ± 2 °C visā testēšanas laikā.

Testēšanas koncentrācijas

38. Izmanto vienu koncentrāciju. Ja vajadzīgas papildu koncentrācijas, tas ir jāpamato. Ja testējamās ķīmiskās vielas toksicitāte (EC_{50}) ir tuvu analītiskās noteikšanas robežai, ieteicams izmantot radioaktīvi marķētu testējamo ķīmisko vielu ar augstu īpatnējo radioaktivitāti. Metālu gadījumā koncentrācijai jābūt virs pamatlīmeņa audos un augsnē.

Atkārtojumi

39. Kinētikas mērījumiem (uzņemšanas un noārdīšanās fāzē) apstrādāto atkārtojuma trauku minimālajam skaitam jābūt trijiem uz katru paraugu ņemšanas punktu. Kopējam sagatavoto atkārtojumu skaitam jābūt pietiekamam, lai nodrošinātu visas paraugu ņemšanas reizes uzņemšanas un noārdīšanās fāzē.
40. Bioloģiskajiem novērojumiem un mērījumiem (piemēram, saussvara un mitrā svara attiecība, tauku saturs) un pamatkoncentrāciju analīzei tārpos un augsnē ir vajadzīgi vismaz 12 negatīvas kontroles atkārtojumu trauki (četrus paraugus ņem sākumā, četrus – uzņemšanas beigās un četrus – noārdīšanās beigās), ja neizmanto šķīdinātāju (izņemot ūdeni). Ja testējamās ķīmiskās vielas pievienošanai izmanto kādu šķīdinātāju vielu, papildus apstrādātajiem atkārtojumiem jānodrošina šķīdinātāja kontrole (četriem atkārtojumu traukiem jāņem paraugi sākumā, četriem – uzņemšanas fāzes beigās un četriem – noārdīšanās fāzes beigās), kas ietver visas sastāvdaļas, izņemot testējamo vielu. Tādā gadījumā var nodrošināt arī četrus papildu negatīvas kontroles atkārtojumu traukus (bez šķīdinātāja), lai ņemtu fakultatīvus paraugus uzņemšanas fāzes beigās. Šos atkārtojumus var bioloģiski salīdzināt ar šķīdinātāja kontroles trauku, lai iegūtu informāciju par šķīdinātāja iespējamo ietekmi uz testēšanas organismiem. Ieteicams noteikt, kāds būtu papildu rezerves atkārtojumu trauku pietiekams skaits (piemēram, astoņi) apstrādei un kontrolei.

Augsnes kvalitātes mērījumu regularitāte

41. Augsnes pH, augsnes mitruma saturs un temperatūra (nepārtraukti) testēšanas telpā ir jānosaka uzņemšanas un noārdīšanās fāžu sākumā un beigās. Augsnes mitruma saturs ir jākontrolē reizi nedēļā, nosverot testēšanas traukus un salīdzinot faktisko svaru ar sākotnējo svaru testēšanas sākumā. Ūdens zudumi ir jākompensē, pievienojot dejonizētu ūdeni.

Tārpu un augsnes paraugu ņemšana un analīze

42. Slietu un enhitreīdu bioakumulācijas testa uzņemšanas un noārdīšanās fāžu grafika piemērs ir sniegts 3. papildinājumā.
43. Testēšanas trauku augsnes paraugus ņem, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju pirms tārpu ielaišanas, kā arī uzņemšanas un noārdīšanās fāžu laikā. Testēšanas laikā nosaka testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas tārpos un augsnē. Parasti nosaka kopējās koncentrācijas augsnē. Var noteikt arī koncentrācijas porūdenī. Tādā gadījumā, pirms sāk pētījumu, jāsniedz pamatojums un paredzētās attiecīgās metodes, ko pēc tam iekļauj pārskatā.
44. Tārpu un augsnes paraugus ņem vismaz sešas reizes uzņemšanas un noārdīšanās fāžu laikā. Ja tiek apliecināta testējamās ķīmiskās vielas stabilitāte, var samazināt augsnes analīžu skaitu. Ieteicams analizēt vismaz trīs atkārtojumus uzņemšanas fāzes sākumā un beigās. Ja uzņemšanas fāzes beigās noteiktā koncentrācija augsnē atšķiras no sākotnējās koncentrācijas vairāk nekā par 30 %, jāanalizē arī augsnes paraugi, kas ņemti citos laikos.
45. Konkrēta atkārtojuma trauka tārpi jāizņem no augsnes katrā paraugu ņemšanas reizē (piemēram, pēc atkārtojuma augsnes izklāšanas seklā traukā un tārpu izņemšanas ar neasu juveliera pinceti) un ātri jānoskalo ar ūdeni seklā stikla vai tērauda traukā. Jāatbrīvojas no liekā ūdens (sk. 34. punktu). Tārpi uzmanīgi jāpārvieto uz iepriekš nosvērtu trauku un nekavējoties jānosver kopā ar zarnu saturu.
46. Pēc tam sliiekām (*Eisenia* sp.) nakts laikā jāļauj iztīrīt zarnas, piemēram, uz mitra filtrpapīra apsegtā Petri traukā (sk. 34. punktu). Pēc zarnu iztīrīšanās jānosaka tārpu svars, lai novērtētu iespējamo biomasas samazinājumu testēšanas laikā (sk. derīguma kritērijus 17. punktā). Enhitreīdus sver un audus analizē bez zarnu iztīrīšanās, jo tas ir tehniski sarežģīti šo tārpu mazā izmēra dēļ. Pēc galīgā svara noteikšanas tārpi ir nekavējoties jānogalina, izmantojot piemērotāko metodi (piemēram, izmantojot šķidro slāpekli vai sasaldējot temperatūrā zem -18°C).
47. Noārdīšanās fāzē tārpi aizvieto piesārņoto zarnu saturu ar tīru augsni. Tas nozīmē, ka mērījumi tārpos, kam nav bijusi zarnu iztīrīšanās (šajā gadījumā enhitreīdos) un kam ņem paraugus tieši pirms noārdīšanās fāzes, ietver piesārņoto augsni zarnās. Attiecībā uz ūdens mazsartārpjiem pieņem, ka pēc noārdīšanās fāzes sākotnējam 4–24 h lielākā daļa piesārņotā zarnu satura ir aizvietota ar tīriem nosēdumiem, piemēram, atsaucē (46). Līdzīgi konstatējumi ir publicēti pārskatos par pētījumiem attiecībā uz radioaktīvi marķēta kadmijs un cinka akumulāciju sliiekās (78). Enhitreīdiem, kam nav bijusi zarnu iztīrīšanās, šā pirmā noārdīšanās fāzes parauga koncentrāciju var uzskatīt par koncentrāciju audos pēc zarnu iztīrīšanās. Lai ņemtu vērā testējamās vielas koncentrācijas atšķaidīšanos ar nepiesārņotu augsni noārdīšanās fāzes laikā, zarnu satura svaru var aplēst pēc tārpu mitrā svara / tārpu pelnu svara vai tārpu saussvara / tārpu pelnu svara attiecības.
48. Augsnes un tārpu paraugus ir ieteicams analizēt tūlīt pēc paņemšanas (t. i., 1–2 dienu laikā), lai novērstu degradāciju vai citus zudumus, un ir ieteicams aprēķināt aptuveno uzņemšanas un noārdīšanās ātrumu testēšanas turpinājumā. Ja analīzi veic vēlāk, paraugi jāuzglabā saskaņā ar piemērotu metodi, piemēram, saldēti ($\leq -18^{\circ}\text{C}$).
49. Jāpārbauda, vai ķīmiskās analīzes precizitāte un atkārtojamība, kā arī testējamās ķīmiskās vielas atguve no augsnes un tārpu paraugiem ir pietiekamas konkrētajai metodei. Pārskatā jānorāda ekstrahēšanas efektivitāte, noteikšanas robeža (turpmāk – LOD) un kvantificēšanas robeža (turpmāk – LOQ). Tāpat ir jāpārbauda, vai testējamā ķīmiskā viela kontroles traukos nav nosakāma koncentrācijās, kas pārsniedz pamatkoncentrācijas. Ja testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas organismā (C_a) kontroles tārpos ir > 0 , tas jāietver kinētisko parametru aprēķinā (sk. 2. papildinājumu). Ar visiem paraugiem testēšanas laikā jārikojas tā, lai pēc iespējas mazinātu piesārņojumu un zudumus (piemēram, testējamās ķīmiskās vielas adsorbcijas dēļ uz paraugu iekārtas).

50. Strādājot ar radioaktīvi marķētām vielām, ir iespējams analizēt pamatvielas un metabolītus. Testējamās ķīmiskās pamatvielas un metabolītu kvantificēšana stabilā stāvoklī vai uzņemšanas fāzes beigās nodrošina svarīgu informāciju. Pēc tam paraugi ir "jāiztīra", lai varētu atsevišķi kvantificēt testējamo ķīmisko pamatvielu. Ja atsevišķi metabolīti pārsniedz 10 % no kopējās radioaktivitātes analizētajā(-os) paraugā(-os), ieteicams identificēt šos metabolītus.
51. Jāreģistrē un pārskatā jānorāda kopējā atguve un testējamās ķīmiskās vielas atguve tārpos, augsnē un, ja izmantoti, uztvērējos ar absorbentiem, lai paturētu iztvaikoto testējamo ķīmisko vielu.
52. Attiecībā uz enhitēriem ir pieļaujami apvienot īpatņu paraugus no konkrēta testēšanas trauka, jo šie tārpi ir mazāki par sliekām. Ja apvienošana nozīmē atkārtojumu skaita samazināšanu, tas ierobežo statistiskās procedūras, ko var piemērot datiem. Ja ir vajadzīga konkrēta statistiskā procedūra un nozīmīgums, testēšanā jāietver pietiekams skaits atkārtojumu testēšanas trauku, lai nodrošinātu vēlamo apvienošanu, procedūru un nozīmīgumu.
53. BAF ieteicams izteikt gan kā kopējā saussvara funkciju, gan, kad vajadzīgs (t. i., ļoti hidrofobām ķīmiskajām vielām), kā tauku satura funkciju. Tauku satura noteikšanai jāizmanto piemērotas metodes (šim nolūkam jāpielāgo dažas no esošajām metodēm, piemēram, atsaucē (31) un (58)). Šajās metodēs izmanto hloroforma/metilspirta ekstrakcijas paņēmieni. Tomēr, lai izvairītos no hloru saturošu šķīdinātāju izmantošanas, jāizmanto pielāgota Bligh un Dyer metode (9), kā aprakstīts atsauce (17). Tā kā dažādas metodes var nenodrošināt identiskas vērtības, ir svarīgi sniegt sīku informāciju par izmantoto metodi. Kad iespējams, t. i., ja ir pieejami pietiekami tārpu audi, tauku analīzi vēlama veikt tam pašam paraugam vai ekstraktam, ko izmantoja testējamās ķīmiskās vielas analīzei, jo tauki nereti ir jānoņem no ekstrakta, pirms to var analizēt hromatogrāfiski (49). Var arī izmantot kontroles dzīvniekus, lai noteiktu tauku saturu, ko pēc tam var izmantot, lai normalizētu BAF vērtības. Šī pēdējā minētā pieeja samazina aprīkojuma piesārņošanu ar testējamo ķīmisko vielu.

DATI UN PĀRSKATU SAGATAVOŠANA

Rezultātu apstrāde

54. Testējamās ķīmiskās vielas uzņemšanas likni iegūst, grafiski attēlojot tās koncentrāciju tārpos / uz tārpiem uzņemšanas fāzē attiecībā pret laiku aritmētiskā skalā. Kad līkne ir sasniegusi plato vai stabilu stāvokli (sk. definīcijas 1. papildinājumā), stabila stāvokļa bioakumulācijas koeficientu (turpmāk – BAFs) aprēķina šādi:

$$\frac{C_a \text{ stabilā stāvoklī vai uzņemšanas fāzes beigās (vidējais)}}{C_s \text{ stabilā stāvoklī vai uzņemšanas fāzes beigās (vidējais)}}$$

C_a ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas organismā.

C_s ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija augsnē.

55. Ja stabils stāvoklis netiek sasniegts, BAFs vietā jānosaka BAF_K, pamatojoties uz ātruma konstantēm, kā aprakstīts turpmāk:

— nosaka akumulācijas koeficientu (BAF_K) kā attiecību k_s/k_e ,

— uzņemšanas un noārdīšanās ātrumus ir vēlama aprēķināt vienlaikus (sk. 2. papildinājuma 11. vienādojumu),

— noārdīšanās ātruma konstanti (k_e) parasti nosaka no noārdīšanās līknes (t. i., testējamās vielas koncentrācijas tārpos noārdīšanās fāzē grafiska attēlojuma); pēc tam aprēķina uzņemšanas ātruma konstanti (k_s), ņemot vērā k_e un C_a vērtību, ko iegūst no uzņemšanas līknes, sk. 2. papildinājumu, kur sniegts šo metožu apraksts; BAF_K un ātruma konstanšu k_s un k_e iegūšanai vēlama izmantot nelineāras parametru aprēķināšanas metodes datorā; ja noārdīšanās acīmredzami nav pirmās kārtas noārdīšanās, jāizmanto sarežģītāki modeļi.

Testēšanas pārskats

56. Testēšanas pārskatā jāiekļauj šāda informācija:

Testējamā ķīmiskā viela:

- jebkāda pieejamā informācija par testējamās ķīmiskās vielas akūtu vai ilgtermiņa toksicitāti (piemēram, EC_{50} , LC_{50} , NOEC) attiecībā uz augsnē dzīvojošiem mazsartārpjiem,
- tīrība, fizikālās īpašības un fizikālās un ķīmiskās īpašības, piemēram, $\log K_{ow}$, šķīdība ūdenī,
- ķīmiskās identifikācijas dati, testējamās vielas avots un ikviena izmantotā šķīdinātāja koncentrācija un identitāte,
- ja izmanto radioaktīvi marķētu testējamo ķīmisko vielu, marķēto atomu precīza atrašanās vieta, īpatnējā radioaktivitāte un radioķīmiskā tīrība.

Testēšanas sugas:

- zinātniskais nosaukums, paveids, avots, jebkāda iepriekšēja apstrāde, aklimatizācija, vecums, izmēra diapazons utt.

Testēšanas apstākļi:

- izmantotā testēšanas procedūra,
- izmantotā apgaismojuma veids un raksturlielumi, kā arī periods(-i),
- testēšanas plāns (piemēram, testēšanas trauku skaits un izmērs, augsnes masa un augsnes slāņa augstums, atkārtojumu skaits, tārpu skaits katrā atkārtojumā, testēšanas koncentrāciju skaits, uzņemšanas un noārdīšanās fāžu ilgums un paraugu ņemšanas regularitāte),
- testēšanas trauku materiāla izvēles pamatojums,
- testējamās vielas sagatavošanas un pievienošanas metode, kā arī konkrētās metodes izvēles pamatojums,
- testēšanas nominālās koncentrācijas, izmērīto vērtību vidējie lielumi un to standartnovirzes testēšanas traukos, kā arī šo vērtību iegūšanas metode,
- mākslīgās augsnes sastāvdaļu avots vai, ja izmanto dabīgas barotnes, augsnes izcelsme, jebkādas iepriekšējās apstrādes apraksts, kontroles trauku rezultāti (izdzīvošana, biomasas attīstība, vairošanās), augsnes raksturlielumi (pH, kopējais organiskā oglekļa saturs, daļiņu lieluma sadalījums (smilšu, sanešu un mālu īpatsvars), WHC_{max} ūdens saturs īpatsvars testēšanas sākumā un beigās, kā arī jebkādi citi veiktie mērījumi),
- sīka informācija par augsnes un tārpu paraugu apstrādi, arī par sagatavošanas, glabāšanas un piesātināšanas procedūrām, ekstrakciju un analītiskajām procedūrām (un precizitāti), ko izmantoja attiecībā uz testējamo vielu tārpos un augsnē, kā arī par tauku saturu (ja to nosaka) un testējamās vielas atgūvi.

Rezultāti:

- kontroles grupu tārpu un katra testēšanas trauka tārpu mirstība, kā arī jebkāda novērotā darbības anomālija (piemēram, izvairīšanās no augsnes, nevairošanās bioakumulācijas testā ar enhitreidiem),
- augsnes un testēšanas organismu saussvara un mitrā svara attiecība (noder normalizācijai),
- tārpu mitrais svars katrā paraugu ņemšanas reizē; sliekām – mitrais svars testēšanas sākumā un katrā paraugu ņemšanas reizē pirms un pēc zarnu iztīrīšanas,
- testēšanas organismu tauku saturs (ja to nosaka),

- līknes, kas attēlo testējamās ķīmiskās vielas uzņemšanas un noārdīšanās kinētiku tārpos un laiku, kurš vajadzīgs, lai sasniegtu stabilu stāvokli,
- C_a un C_s (ar standartnovirzi un diapazonu, ja vajadzīgs) visām paraugu ņemšanas reizēm (C_a izsaka g/kg visa ķermeņa mitrā un saussvara, C_s izsaka g/kg augsnes mitrā un saussvara); ja ir vajadzīgs biocenozes un augsnes akumulācijas koeficients (turpmāk – BSAF) (piemēram, lai salīdzinātu rezultātus no diviem vai vairākiem testiem, kas veikti ar dzīvniekiem ar dažādu tauku saturu), C_a var papildus izteikt kā g/kg⁻¹ organisma tauku saturu, savukārt C_s var izteikt kā g/kg⁻¹ augsnes organiskā oglekļa,
- BAF (kas izteikts kā kg augsnes/kg⁻¹ tārpu), augsnes uzņemšanas ātruma konstante k_s (izteikta kā g augsnes/kg⁻¹ tārpu dienā) un noārdīšanās ātruma konstante k_e (uz dienu); papildus var norādīt BSAF (izteikts kā kg augsnes neorganiskā oglekļa/kg⁻¹ tārpu tauku saturu),
- ja noteikti – ķīmiskās pamatvielas, metabolītu un saistītu atlieku īpatsvari (t. i., testējamās ķīmiskās vielas īpatsvars, ko nevar ekstrahēt ar parastām ekstrakcijas metodēm), kas noteikti augsnē un testēšanas dzīvniekos,
- datu statistiskajai analīzei izmantotās metodes.

Rezultātu novērtēšana:

- rezultātu atbilstība 17. punktā uzskaitītajiem derīguma kritērijiem,
- neparedzēti vai neparasti rezultāti, piemēram, testējamās ķīmiskās vielas nepilnīga noārdīšanās testēšanas dzīvniekos.

LITERATŪRA

- (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. Physiol. 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.
- (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 W (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) Eiropas Parlamenta un Padomes 2006. gada 18. decembra Regula (EK) Nr. 1907/2006, kas attiecas uz ķīmikāliju reģistrēšanu, vērtēšanu, licencēšanu un ierobežošanu (REACH) un ar kuru izveido Eiropas Ķīmikāliju aģentūru, groza Direktīvu 1999/45/EK un atceļ Padomes Regulu (EEK) Nr. 793/93 un Komisijas Regulu (EK) Nr. 1488/94, kā arī Padomes Direktīvu 76/769/EEK un Komisijas Direktīvu 91/155/EEK, Direktīvu 93/67/EEK, Direktīvu 93/105/EK un Direktīvu 2000/21/EK (OV L 396, 30.12.2006., 1. lpp.).
- (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 *Oligochates*, 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. lpp. Pieejams lejupielādēšanai: <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 S.
- (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 S.
- (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.
- (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) Šā pielikuma C.8. nodaļa "Toksicitātes noteikšana sliekām".
- (49) Šā pielikuma C.13. nodaļa "Biokoncentrācija – caurplūdes tests ar zivīm".
- (50) Šā pielikuma C.21. nodaļa "Augsnes mikroorganismi – slāpekļa transformācijas tests".
- (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 Bioakkumulationstests 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, Luttik 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 (Enchytraeidae, Clitellata, Annelida). *Carolinea* 57: 93-100.
- (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) Sterenberg 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.
-

1. papildinājums

DEFINĪCIJAS

Bioakumulācija ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas pieaugums organismā vai uz tā attiecībā pret testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju apkārtējā barotnē. Bioakumulācija izriet gan no biokoncentrācijas, gan biopalielināšanās procesa (sk. turpmāk).

Biokoncentrācija ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas pieaugums organismā vai uz tā, ko izraisa ķīmiskās vielas uzņemšana tikai no apkārtējās barotnes (t. i., caur ķermeņa virsmu un uzņemto augsni), attiecībā pret testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju apkārtējā barotnē.

Biopalielināšanās ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas pieaugums organismā vai uz tā, ko galvenokārt izraisa piesārņotas barības vai laupījuma uzņemšana, attiecībā pret testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju barībā vai laupījumā. Biopalielināšanās var novest pie testējamās vielas pārvietošanās vai akumulācijas barošanās tīklos.

Testējamās ķīmiskās vielas **noārdīšanās** ir šīs ķīmiskās vielas zudums no testēšanas organisma audiem, pateicoties aktīviem vai pasīviem procesiem, kas notiek neatkarīgi no testējamās vielas klātesības vai neesības apkārtējā barotnē.

Bioakumulācijas koeficients (BAF) šā bioakumulācijas testa jebkurā uzņemšanas fāzes laikā ir testējamās ķīmiskās vielas koncentrācija testēšanas organismā vai uz tā (C_a g/kg⁻¹ tārpū saussvara), ko dala ar testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju apkārtējā barotnē (C_s kā g/kg⁻¹ augsnes saussvara); BAF vienības ir kg augsnes/kg⁻¹ tārpū.

Stabila stāvokļa bioakumulācijas koeficients (BAF_{ss}) ir BAF stabilā stāvoklī un būtiski nemainās ilgākā laikposmā, šajā laikā nemainoties testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijai apkārtējā barotnē (C_s kā g/kg⁻¹ augsnes saussvara).

Bioakumulācijas koeficienti, kas aprēķināti tieši no augsnes uzņemšanas ātruma konstantes un noārdīšanās ātruma konstantes (k_s un k_e , sk. turpmāk) attiecības, ir kinētiskās bioakumulācijas koeficienti (BAF_k).

Biocenozes un augsnes akumulācijas koeficients (BSAF) ir testējamās ķīmiskās vielas ar taukiem normalizēta koncentrācija testēšanas organismā vai uz tā, ko dala ar testējamās ķīmiskās vielas ar organisko oglekli normalizētu koncentrāciju augsnē stabilā stāvoklī. Pēc tam C_a izsaka kā g/kg⁻¹ organisma tauku satura, savukārt C_s izsaka kā g/kg⁻¹ augsnes organiskā oglekļa satura; BSAF vienības ir kg organiskā oglekļa/kg⁻¹ tauku.

Plato vai stabils stāvoklis ir līdzsvars starp uzņemšanas un noārdīšanās procesiem, kas notiek vienlaikus ekspozīcijas fāzē. BAF grafiskajā attēlojumā stabils stāvoklis pret laiku ir sasniegts tad, kad līkne kļūst paralēla laika asij un trīs secīgas BAF analīzes paraugiem, kas ņemti vismaz divu dienu intervālos, savā starpā sakrīt vismaz $\pm 20\%$ robežās, un starp trijiem paraugu ņemšanas periodiem nav statistiski būtisku atšķirību. Testējamām ķīmiskajām vielām, ko uzņem lēni, piemērotāki intervāli ir septiņas dienas (49).

Organiskā oglekļa un ūdens sadalīšanās koeficients (K_{oc}) ir ķīmiskās vielas koncentrācijas augsnes organiskā oglekļa daļā vai uz tās un ķīmiskās vielas koncentrācijas ūdenī attiecība līdzsvara stāvoklī.

Oktanola un ūdens sadalīšanās koeficients (K_{ow}) ir ķīmiskās vielas šķīdības n-oktanolā un ūdenī attiecība līdzsvara stāvoklī, ko dažreiz izsaka arī kā P_{ow} . K_{ow} logaritmu ($\log K_{ow}$) izmanto kā rādītāju ķīmiskās vielas bioakumulācijas spējai ūdens organismos.

Uzņemšanas vai ekspozīcijas fāze ir laiks, kurā testēšanas organismi ir pakļauti testējamās ķīmiskās vielas iedarbībai.

Augsnes uzņemšanas ātruma konstante (k_s) ir skaitlisks lielums, kas apraksta testējamās vielas koncentrācijas testēšanas organismā vai uz tā palielināšanās ātrumu, ko izraisa uzņemšanas no augsnes fāze. k_s izsaka g augsnes/kg⁻¹ tārpū dienā.

Noārdīšanās fāze ir laiks pēc testēšanas organismu pārvietošanas no piesārņotas barotnes uz barotni bez testējamās vielas, kura laikā pēta ķīmiskās vielas noārdīšanos (vai neto zudumu) testēšanas organismos.

Noārdīšanās ātruma konstante (k_e) ir skaitlisks lielums, kas apraksta testējamās vielas koncentrācijas testēšanas organismā vai uz tā samazināšanās ātrumu pēc testēšanas organismu pārvietošanas no barotnes, kura satur testējamo vielu, uz barotni bez ķīmiskajām vielām. k_e izsaka uz dienu (d^{-1}).

Testējamā ķīmiskā viela ir jebkāda viela vai maisījums, ko testē, izmantojot šo testēšanas metodi.

2. papildinājums

Uzņemšanas un noārdīšanās parametru aprēķināšana

Bioakumulācijas testa galvenais mērķparametrs ir bioakumulācijas koeficients (turpmāk – BAF). Noteikto BAF var aprēķināt, dādot koncentrāciju testēšanas organismā (C_a) ar koncentrāciju augsnē (C_s) stabilā stāvoklī. Ja stabilu stāvokli nesasniedz uzņemšanas fāzē, stabila stāvokļa bioakumulācijas koeficienta (turpmāk – BAF_{ss}) vietā no ātrumu konstantēm aprēķina kinētiskās bioakumulācijas koeficientu (turpmāk – BAF_K). Tomēr jānorāda, vai BAF pamatā ir koncentrācijas stabila stāvoklī vai ne.

Parasti BAF_K, augsnes uzņemšanas ātruma konstanti (k_s) un noārdīšanās ātruma konstanti (k_e) iegūst, izmantojot nelineāras parametru aprēķināšanas metodes datorā, piemēram, pamatojoties uz modeļiem, kas aprakstīti atsaucē (68). Ja tiek ievadīts secīgu laika koncentrāciju datu kopums un vienādojumu modeļi:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad (1. \text{ vienādojums})$$

vai

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad (2. \text{ vienādojums})$$

kur:

C_a = ķīmiskās vielas koncentrācija tārpos (g/kg⁻¹ mitrā svara vai saussvara);

k_s = uzņemšanas ātruma konstante audos (g augsnes/kg⁻¹ tārpu dienā);

C_s = ķīmiskās vielas koncentrācija augsnē (g/kg⁻¹ mitrā svara vai saussvara);

k_e = noārdīšanās ātruma konstante (uz dienu);

t_c = laiks uzņemšanas fāzes beigās,

šīs datorprogrammas aprēķina BAF_K, k_s un k_e vērtības.

Ja pamatkoncentrācija iedarbībai nepakļautos tārpos, piemēram, 0. dienā, būtiski atšķiras no nulles (tā tas var būt, piemēram, metālu gadījumā), šī pamatkoncentrācija ($C_{a,0}$) ir jāietver šajos vienādojumos, proti, šādi:

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad (3. \text{ vienādojums})$$

un

$$C_a = C_{a,0} + \frac{k_s}{k_e} \times C_s (e^{-k_e (t-t_c)} - e^{-k_e t}) \quad t > t_c \quad (4. \text{ vienādojums})$$

Gadījumos, kad tiek novērota testējamās ķīmiskās vielas koncentrācijas būtiska samazināšanās augsnē uzņemšanas fāzes laikā, var izmantot šādus modeļus, piemēram, atsauce (67) un (79):

$$C_s = C_0 (e^{-k_0 t}) \quad (5. \text{ vienādojums})$$

kur:

C_s = ķīmiskās vielas koncentrācija augsnē (g/kg⁻¹ mitrā svara vai saussvara);

k_0 = degradācijas ātruma konstante augsnē (uz dienu);

C_0 = ķīmiskās vielas sākotnējā koncentrācija augsnē (g/kg⁻¹ mitrā svara vai saussvara);

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times (e^{-k_0 t} - e^{-k_e t}) \quad 0 < t < t_c \quad (6. \text{ vienādojums})$$

$$C_a = \frac{k_s}{k_e - k_0} \times e^{-k_0 t_c} - e^{-k} e^{t_c} * e^{-k(t-t_c)} \quad t > t_c \quad (7. \text{ vienādojums})$$

kur:

C_a = ķīmiskās vielas koncentrācija tārpos (g/kg^{-1} mitrā svara vai saussvara);

k_s = uzņemšanas ātruma konstante audos ($\text{g augsnes/kg tārpu dienā}$);

k_0 = degradācijas ātruma konstante augsnē (uz dienu);

k_e = noārdīšanās ātruma konstante (uz dienu);

t_c = laiks uzņemšanas fāzes beigās.

Ja stabils stāvoklis tiek sasniegts uzņemšanas fāzē (t. i., $t = \infty$), 1. vienādojumu

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s (1 - e^{-k} e^t) \quad 0 < t < t_c \quad (1. \text{ vienādojums})$$

var reducēt šādi:

$$C_a = \frac{k_s}{k_e} \times C_s$$

vai šādi:

$$C_a/C_s = k_s/k_e = \text{BAF}_K \quad (8. \text{ vienādojums})$$

Tādā gadījumā $k_s/k_e \times C_s$ ir pieeja, kā noteikt testējamās vielas koncentrāciju tārpu audos stabilā stāvoklī ($C_{a,ss}$).

Biocenozes un augsnes akumulācijas koeficientu (turpmāk – BSAF) var aprēķināt šādi:

$$\text{BSAF} = \text{BAF}_K * \frac{f_{oc}}{f_{lip}} \quad (9. \text{ vienādojums}),$$

kur f_{oc} ir augsnes organiskā oglekļa daļa un f_{lip} ir tārpu tauku daļa, ko abas ir vēlams noteikt no testēšanas laikā ņemtiem paraugiem, pamatojoties attiecīgi vai nu uz saussvaru, vai mitro svaru.

Noārdīšanās kinētiku var modelēt, izmantojot noārdīšanās fāzes datus un piemērojot turpmāk norādīto vienādojuma modeli un uz datoru pamatotu nelineārās parametru aprēķināšanas metodi. Ja datu punkti, kas grafiski attēloti attiecībā pret laiku, norāda uz testējamās vielas koncentrācijas dzīvniekos nepārtrauktu eksponenciālu samazināšanos, var izmantot viena nodalījuma modeli (9. vienādojums), lai aprakstītu noārdīšanās gaitu laikā.

$$C_a(t) = C_{a,ss} \times e^{-k_e t} \quad (10. \text{ vienādojums})$$

Noārdīšanās procesi dažreiz, izrādās, ir divfāzu, uzrādot C_a strauju samazināšanos agrīnās fāzēs, kas pēc tam pāriet uz testējamo vielu lēnāku zudumu noārdīšanās vēlākās fāzēs, piemēram, atsauce (27) un (68). Abas fāzes var interpretēt ar pieņēmumu, ka organismā ir divi atšķirīgi nodalījumi, no kuriem testējamā viela izzūd atšķirīgos ātrumos. Šādos gadījumos jāizpēta konkrēta literatūra, piemēram, atsauce (38) (39) (40) un (78).

Izmantojot iepriekš norādītos vienādojumu modeļus, kinētikas parametrus (k_s un k_e) var aprēķināt arī vienā piegājienā, vienlaikus piemērojot pirmās kārtas kinētikas modeli visiem datiem gan no uzņemšanas, gan noārdīšanās fāzes. Saistībā ar metodi, kas ļautu apvienoti aprēķināt uzņemšanas un noārdīšanās ātruma konstantes, var atsaukties uz atsauci (41), (73) un (70).

$$C_a = \left[\frac{K_s}{K_e} \cdot C_s (1 - e^{-k_e t}) \times (m = 1) \right] + \left[\frac{K_s}{K_e} \times C_s (e^{-K_e(t-t_c)} - e^{-K_e t}) \times (m = 2) \right] \quad (11. \text{ vienādojums})$$

Piezīme. Ja uzņemšanas un noārdīšanās parametrus nosaka vienlaikus ar apvienotajiem uzņemšanas un noārdīšanās datiem, "m" 11. vienādojumā ir elements, kas ļauj datorprogrammā vienādojuma apakšelementus iedalīt attiecīgās fāzes datu kopām un pareizi veikt novērtējumu ($m = 1$ uzņemšanas fāzei; $m = 2$ noārdīšanās fāzei).

Tomēr šie vienādojumu modeļi ir jāizmanto piesardzīgi, sevišķi ja testēšanas laikā mainās testējamās ķīmiskās vielas bioloģiskā pieejamība vai (bio)noārdīšanās spēja (sk., piemēram, atsauci (79).)

3. papildinājums

AUGSNES BIOAKUMULĀCIJAS TESTU GRAFIKA PIEMĒRI

Tests ar sliekām

a) Uzņemšanas fāze ar astoņu paraugu ņemšanas datumiem, ko izmanto kinētikas aprēķiniem

Diena	Darbība
– 6	Sagatavotās augsnes kondicionēšana 48 h.
– 4	Augsnes daļas piesātināšana ar testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu; šķīdinātāja, ja lietots, iztvaikošana; samaisīšana ar augsnes sastāvdaļām; augsnes sadalīšana testēšanas traukos; līdzsvara iestāšanās testēšanas apstākļos četras dienas (trīs nedēļas ar metālu piesātinātai augsnei).
– 3 līdz – 1	Testēšanas organismu izņemšana no kultūras aklimatizācijai; augsnes sastāvdaļu sagatavošana un mitrināšana.
0	Temperatūras un augsnes pH noteikšana; augsnes paraugu paņemšana no apstrādātajiem traukiem un šķīdinātāju kontroles traukiem, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju; barības devas pievienošana; tārpu svēršana un sadalīšana pēc nejaušības principa pa testēšanas traukiem; pietiekamu tārpu apakšparaugu paturēšana, lai noteiktu analītiskās pamatvērtības, mitro un saussvaru un tauku saturu; visu testēšanas trauku svēršana, lai kontrolētu augsnes mitrumu; gaisa padeves kontrole, ja izmanto slēgtu testēšanas sistēmu.
1	Gaisa padeves kontrole, tārpu darbības un temperatūras reģistrēšana; augsnes un tārpu paraugu ņemšana, lai noteiktu testējamās vielas koncentrāciju.
2	Tāpat kā 1. diena.
3	Gaisa padeves, tārpu darbības un temperatūras kontrole.
4	Tāpat kā 1. diena.
5–6	Tāpat kā 3. diena.
7	Tāpat kā 1. diena; barības devas pievienošana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus un kompensējot iztvaikojušo ūdeni.
8–9	Tāpat kā 3. diena.
10	Tāpat kā 1. diena.
11–13	Tāpat kā 3. diena.
14	Tāpat kā 1. diena; barības devas pievienošana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus un kompensējot iztvaikojušo ūdeni.
15–16	Tāpat kā 3. diena.
17	Tāpat kā 1. diena.
18–20	Tāpat kā 3. diena.
21	Tāpat kā 1. diena; temperatūras un augsnes pH noteikšana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus; uzņemšanas fāzes beigas; tārpu pārvietošana no atlikušajiem apstrādātajiem atkārtojumiem uz traukiem ar tīru augsni, lai sāktu noārdīšanās fāzi (bez zarnu iztīrīšanas); augsnes un tārpu paraugu ņemšana no šķīdinātāja kontroles traukiem.
	Pirmsekspozīcijas darbības (līdzsvara iestāšanās fāze) jāparedz, ņemot vērā testējamās ķīmiskās vielas īpašības.
	Trešās dienas darbības ir jāveic katru dienu (vismaz darbdiēnās).

b) Noārdīšanās fāze

Diena	Darbība
– 6	Augsnes sastāvdaļu sagatavošana un mitrināšana; sagatavotās augsnes kondicionēšana 48 h.
– 4	Augsnes sastāvdaļu samaisīšana; augsnes sadalīšana pa testēšanas traukiem; inkubācija testa apstākļos četras dienas.
0 (uzņemšanas fāzes beigas)	Temperatūras un augsnes pH noteikšana; tārpu svēršana un sadalīšana pēc nejaušības principa pa testēšanas traukiem; barības devas pievienošana; tārpu pārvietošana no atlikušajiem apstrādātajiem atkārtojumiem uz traukiem ar tīru augsni; augsnes un tārpu paraugu ņemšana pēc 4–6 h, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju.
1	Gaisa padeves kontrole, tārpu darbības un temperatūras reģistrēšana; augsnes un tārpu paraugu ņemšana, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju.
2	Tāpat kā 1. diena.
3	Gaisa padeves, tārpu darbības un temperatūras kontrole.
4	Tāpat kā 1. diena.
5–6	Tāpat kā 3. diena.
7	Tāpat kā 1. diena; barības devas pievienošana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus un kompensējot iztvaikojušo ūdeni.
8–9	Tāpat kā 3. diena.
10	Tāpat kā 1. diena.
11–13	Tāpat kā 3. diena.
14	Tāpat kā 1. diena; barības devas pievienošana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus un kompensējot iztvaikojušo ūdeni.
15–16	Tāpat kā 3. diena.
17	Tāpat kā 1. diena.
18–20	Tāpat kā 3. diena.
21	Tāpat kā 1. diena; temperatūras un augsnes pH noteikšana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus; augsnes un tārpu paraugu ņemšana no šķīdinātāja kontroles traukiem.
	Augsne pirms noārdīšanās fāzes sākuma jāsgatavo tāpat kā pirms uzņemšanas fāzes.
	Trešās dienas darbības ir jāveic katru dienu (vismaz darbdiēnās).

Tests ar enhitreīdiem

a) Uzņemšanas fāze ar astoņu paraugu ņemšanas datumiem, ko izmanto kinētikas aprēķiniem

Diena	Darbība
– 6	Sagatavotās augsnes kondicionēšana 48 h.
– 4	Augsnes daļas piesātināšana ar testējamās ķīmiskās vielas šķīdumu; šķīdinātāja, ja lietots, iztvaikošana; samaisīšana ar augsnes sastāvdaļām; augsnes sadalīšana testēšanas traukos; līdzsvara iestāšanās testēšanas apstākļos četras dienas (trīs nedēļas ar metālu piesātinātai augsnei).

Diena	Darbība
– 3 līdz – 1	Testēšanas organismu izņemšana no kultūras aklimatizācijai; augsnes sastāvdaļu sagatavošana un mitrināšana.
0	Temperatūras un augsnes pH noteikšana; augsnes paraugu paņemšana no apstrādātajiem traukiem un šķīdinātāju kontroles traukiem, lai noteiktu testējamās ķīmiskās vielas koncentrāciju; barības devas pievienošana augsnei; tārpu svēršana un sadalīšana pēc nejaušības principa pa testēšanas traukiem; pietiekamu tārpu apakšparaugu paturēšana, lai noteiktu analītiskās pamatvērtības, mitro un saussvaru un tauku saturu; visu testēšanas trauku svēršana, lai kontrolētu augsnes mitrumu; gaisa padeves kontrole, ja izmanto slēgtu testēšanas sistēmu.
1	Gaisa padeves kontrole, tārpu darbības un temperatūras reģistrēšana; augsnes un tārpu paraugu ņemšana, lai noteiktu testējamās vielas koncentrāciju.
2	Tāpat kā 1. diena.
3	Gaisa padeves, tārpu darbības un temperatūras kontrole.
4	Tāpat kā 1. diena.
5–6	Tāpat kā 3. diena.
7	Tāpat kā 1. diena; barības devas pievienošana augsnei; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus un kompensējot iztvaikojušo ūdeni.
9	Tāpat kā 1. diena.
10	Tāpat kā 3. diena.
11	Tāpat kā 1. diena.
12–13	Tāpat kā 3. diena.
14	Tāpat kā 1. diena; barības devas pievienošana augsnei; temperatūras un augsnes pH noteikšana; augsnes mitruma kontrole, atkārtoti nosverot testēšanas traukus; uzņemšanas fāzes beigas; tārpu pārvietošana no atlikušajiem apstrādātajiem atkārtojumiem uz traukiem ar tīru augsni, lai sāktu noārdīšanās fāzi (bez zarnu iztīrīšanas); augsnes un tārpu paraugu ņemšana no šķīdinātāja kontroles traukiem.
	Pirmsekspozīcijas darbības (līdzsvara iestāšanās fāze) jāparedz, ņemot vērā testējamās ķīmiskās vielas īpašības.
	Trešās dienas darbības ir jāveic katru dienu (vismaz darbdiēnās).

4. papildinājums

Mākslīga augsne – sagatavošanas un glabāšanas ieteikumi

Tā kā visu gadu var nebūt pieejamas dabīgas augsnes no konkrēta avota un tā kā vietējie organismi, kā arī mikropiesārņotāju klātesība var ietekmēt testēšanu, šajā testā ir ieteicams izmantot mākslīgu substrātu, proti, mākslīgu augsni saskaņā ar šā pielikuma C.8. nodaļu "Toksiķitātes noteikšana sliekām"(48). Vairākas testēšanas sugas spēj izdzīvot, augt un vairoties šādā augsnē, turklāt ir nodrošināta pēc iespējas lielāka standartizācija, kā arī testēšanas un kultivēšanas apstākļu salīdzināmība laboratorijas ietvaros un starp laboratorijām.

Augsnes sastāvdaļas

Kūdra	10 %	Sfagnu kūdra saskaņā ar ESAO Pamatnostādnēm Nr. 207 (48).
Kvarca smiltis	70 %	Rūpnieciskās kvarca smiltis (izžāvētas ar gaisu); daļiņu izmērs: vairāk nekā 50 % daļiņu jābūt 50–200 µm diapazonā, bet visām daļiņām jābūt ≤ 2 mm.
Kaolīna māli	20 %	Kaolīnīta saturs: ≥ 30 %.
Kalcija karbonāts	≤ 1 %	CaCO ₃ , pulverizēts, ķīmiski tīrs.

Ir iespējams arī samazināt mākslīgās augsnes organiskā oglekļa saturu, piemēram, samazinot kūdras saturu līdz 4–5 % no sausas augsnes un attiecīgi palielinot smilšu saturu. Šādi samazinot organiskā oglekļa saturu, var samazināt testējamās ķīmiskās vielas adsorbēšanas spējas augsnē (organiskajā ogleklī) un palielināt testējamās ķīmiskās vielas pieejamību tārpēm (74). Ir pierādīts, ka *Enchytraeus albidus* un *Eisenia fetida* var nodrošināt atbilstību derīguma kritērijiem par vairošanos, ja tos testē lauka augsnē ar zemāku organiskā oglekļa saturu, piemēram, 2,7 % (33) (61), kā arī ir gūta pieredze, ka to var panākt arī ar mākslīgu augsni, kuras kūdras saturs ir 5 %.

Sagatavošana

Augsnes sausās sastāvdaļas rūpīgi samaisa (piemēram, liela izmēra laboratorijas maisītājā). Tas jā dara aptuveni vienu nedēļu pirms testa sākšanas. Samaisītās augsnes sausās sastāvdaļas ir jāmitrina ar dejonizētu ūdeni vismaz 48 h pirms testējamās vielas pievienošanas, lai līdzsvarotu/stabilizētu skābumu. Lai noteiktu pH, izmanto augsnes un 1 M KCl šķīduma maisījumu 1:5 attiecībā. Ja pH vērtība nav vajadzīgajā diapazonā (6,0 ± 0,5), augsnei pievieno pietiekamu daudzumu CaCO₃ vai sagatavo jaunu augsnes sēriju.

Mākslīgas augsnes maksimālo ūdens aiztures spēju (turpmāk – WHC) nosaka saskaņā ar ISO 11268-2 (35). Vismaz divas dienas pirms testa sākšanas sauso mākslīgo augsni mitrina, pievienojot pietiekami daudz dejonizēta vai rekonstituēta ūdens, lai iegūtu aptuveni pusi no galīgā ūdens satura. Galīgajam ūdens saturam jābūt 40–60 % no maksimālās WHC. Testēšanas sākumā iepriekš samitrināto augsni sadala tādā skaitā daļā, cik daudz ir testēšanas koncentrāciju un testēšanā izmantoto kontroles trauku, un mitruma saturu koriģē 40–60 % apmērā no maksimālās ūdens aiztures spējas (turpmāk – WHC_{max}), izmantojot testējamās vielas šķīdumu un/vai pievienojot dejonizētu vai rekonstituētu ūdeni. Mitruma saturu nosaka testēšanas sākumā un beigās (pie 105 °C). Tam jābūt optimāli piemērotam sugu vajadzībām (mitruma saturu var pārbaudīt arī šādi: kad augsni maigi spiež rokā, starp pirkstiem jāparādās mazām ūdens pilītēm).

Glabāšana

Mākslīgās augsnes sausās sastāvdaļas var uzglabāt istabas temperatūrā līdz izmantošanai. Sagatavoto, iepriekš samitrināto augsni var uzglabāt vēsā vietā ne ilgāk kā trīs dienas pirms tās piesātināšanas. Jācenšas pēc iespējas samazināt ūdens iztvaikošanu. Ar testējamo vielu piesātināta augsne ir jāizmanto nekavējoties, ja vien nav pieejama informācija, kas norāda, ka konkrēto augsni var uzglabāt un ka tas neietekmē testējamās vielas toksicitāti un bioloģisko pieejamību. Pēc tam piesātinātās augsnes paraugus var uzglabāt konkrētajai testējamajai vielai ieteiktajos apstākļos līdz analīzes veikšanai.

5. papildinājums

Sauszemes mazsartārpu sugas, kas ir ieteicamas testiem par bioakumulāciju no augsnes**Sliekas**

Ieteicamā testēšanas suga ir *Eisenia fetida* (Savigny, 1826. gads), kas piederīga *Lumbricidae* dzimtai. Kopš 1972. gada tā ir iedalīta divās apakšsugās (*Eisenia fetida* un *Eisenia andrei* (10)). Saskaņā ar Jaenike (36) tās ir īstas, atsevišķas sugas. *Eisenia fetida* var viegli atpazīt pēc tās gaiši dzeltenajām starpposmu svītrām, savukārt *Eisenia andrei* ir vienveidīga, tumši sarkana krāsa. Sākotnēji šīs sugas, visticamāk, izveidojušās Melnās jūras reģionā, taču pašlaik sastopamas visā pasaulē, it sevišķi antropogēni izmainītās dzīvotnēs, piemēram, komposta kaudzēs. Abas sugas var izmantot ekotoksikoloģijas un bioakumulācijas testiem.

Eisenia fetida un *Eisenia andrei* ir plaši pieejamas, piemēram, kā zivju ēsma. Salīdzinājumā ar citām *Lumbricidae* dzimtas sliekām tām ir īss dzīves cikls, un briedumu tās sasniedz aptuveni 2–3 mēnešu laikā (istabas temperatūrā). To optimālā vides temperatūra ir aptuveni 20–24 °C. Tās dod priekšroku samērā mitriem substrātiem ar gandrīz neitrālu pH un augstu organiskā materiāla saturu. Tā kā šīs sugas ir tikušas plaši izmantotas standartizētos ekotoksikoloģijas testos jau aptuveni 25 gadus, to kultivēšana ir stabili iedibināta (48) (77).

Abas sugas var audzēt daudzās dažādās dzīvnieku izcelsmes atliekās. Ieteicamā pavairošanas barotne saskaņā ar ISO (35) ir 50:50 maisījums no zirgu vai liellopu mēsliem un kūdras. Barotnes pH vērtībai jābūt aptuveni 6–7 (koriģē ar kalcija karbonātu), jābūt zema jonu vadītspējai (zem 6 mS/cm vai sāls koncentrācija zem 0,5 %), un tā nedrīkst būt pārmērīgi piesāpota ar amonjaku vai dzīvnieku urīnu. Turklāt var izmantot tirdzniecībā pieejamu dārzniecības augsni bez piedevām vai mākslīgu augsni saskaņā ar ESAO (48), vai 50:50 šo abu substrātu maisījumu. Substrātam jābūt mitram, bet ne pārāk slapjam. Ir piemērotas pavairošanas kastes ar 10–50 litru tilpumu.

Lai iegūtu standarta vecuma un svara tārpus, kultivēšanu ieteicams sākt ar kokoniem. Tāpēc pavairošanas kastē ar svaigu substrātu ielaiž pieaugušus tārpus, lai tie izveidotu kokonus. Praktiskā pieredze ir parādījusi, ka populācijas blīvums aptuveni 100 pieaugušu tārpu apmērā uz kilogramu substrāta (mitrais svars) nodrošina labus vairošanās rādītājus. Pēc 28 dienām pieaugušos tārpus izņem no kastes. No kokoniem izšķīlušās sliekas izmanto testēšanā, kad tās ir nobriedušas vismaz pēc diviem mēnešiem, bet ne vēlāk kā pēc 12 mēnešiem.

Iepriekš aprakstīto sugu tārpus var uzskatīt par veselīgiem, ja tie pārvietojas cauri substrātam, necenšas substrātu pamest un nepārtraukti vairojas. Īoti lēna pārvietošanās vai dzeltena aizmugures daļa (*Eisenia fetida* gadījumā) liecina par substrāta noplicināšanos. Tādā gadījumā ieteicams svaigs substrāts un/vai mazāks skaits dzīvnieku vienā kastē.

Atlasītas papildu atsauces

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.

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.

Enhitreidi

Ieteicamā testēšanas suga ir *Enchytraeus albidus* (Henle, 1837. gads) (baltie tārpi). *Enchytraeus albidus* ir viena no lielākajām (līdz 15 mm) sugām posmtārpu mazsartārpu *Enchytraeidae* dzimtā un ir sastopama visā pasaulē, piemēram, atsauce (8). *Enchytraeus albidus* ir sastopama jūras, saldūdens un zemes dzīvotnēs, galvenokārt trūdošās organiskās vielās (jūraszāle, komposts) un reti plāvēs (42). Šīs sugas sastopamība ļoti dažādās ekosistēmās un dažas morfoloģiskas variācijas liecina, ka tai varētu būt dažādas ciltis.

Enchytraeus albidus ir pieejama tirdzniecībā, to pārdod kā zivju barību. Ir jāpārbauda, vai kultūra nav piesāpota ar citu kultūru, parasti ar mazākām sugām (60). Ja notikusi piesārņošanās, visi tārpi ir jānomazgā ar ūdeni Petri traukā. Pēc tam izvēlas lielus pieaugušus *Enchytraeus albidus* īpatņus (izmantojot stereomikroskopu), lai uzsāktu kultivēšanu. No visiem

pārējiem tārpiem atbrīvojas. Šīs sugas dzīves cikls ir īss, jo briedums tiek sasniegts 33. dienā (pie 18 °C) līdz 74. dienā (pie 12 °C). Testēšanai jāizmanto tikai tādas kultūras, kas ir noturētas laboratorijā vismaz piecas nedēļas (viena paaudze) un nav uzrādījušas problēmas.

Ir piemērotas arī citas *Enchytraeus* ģints sugas, it sevišķi *Enchytraeus luxuriosus*. Šī suga ir īsts augsnes iedzīvotājs, kas ir no jauna aprakstīts atsaucē (65). Ja izmanto citas *Enchytraeus* sugas, tās ir skaidri jāidentificē un pārskatā jāsniedz pamatojums, kādēļ izraudzīta šī suga.

Enchytraeus crypticus (Westheide un Graefe, 1992. gads) ir suga, kas piederīga tai pašai grupai, kurai piederīga *Enchytraeus luxuriosus*. Šī suga nav pārliecinoši konstatēta lauka vidē un ir aprakstīta tikai saistībā ar slieku kultūrām un komposta kaudzēm (Römbke, 2003. gads). Tāpēc nav zināmas tās sākotnējās ekoloģiskās vajadzības. Tomēr nesen veikti laboratorijas pētījumi ar dažādām lauka augsnēm ir apstiprinājuši, ka šī suga ļoti labi panes dažādas augsnes īpašības, piemēram, pH un augsnes struktūru (Jänsch et al., 2005. gads). Pēdējos gados šī suga ir bieži tikusi izmantota ekotoksikoloģijas pētījumos, pateicoties tās pavairošanas un testēšanas vienkāršībai (piemēram, Kuperman et al., 2003. gads). Tomēr šīs sugas tārpi ir maza izmēra (3–12 mm; vidēji: 7 mm (Westheide un Müller, 1996. gads), kas apgrūtina darbu ar tiem salīdzinājumā ar *Enchytraeus albidus*. Izmantojot šo sugu *Enchytraeus albidus* vietā, testēšanas trauks var būt mazāks, bet tas nav obligāti. Turklāt jāņem vērā, ka šī suga ļoti ātri vairojas un ka vienas paaudzes nobriešanas laiks ir mazāk nekā 20 dienas 20 ± 2 °C (Achazi et al., 1999. gads) un pat mazāks augstākās temperatūrās.

Enchytraeus albidus sugu enhitreidus (kā arī citas *Enchytraeus* sugas) var pavairot lielās plastmasas kastēs (piemēram, 30 × 60 × 10 cm vai 20 × 12 × 8 cm, kas ir piemērotas maza izmēra tārpu kultivēšanai), kuras piepildītas ar mākslīgas augsnes maisījumu un tirdzniecībā pieejamu, nepiesārņotu dārzniecības augsni bez piedevām. Jāizvairās no komposta materiāla izmantošanas, jo tas var saturēt toksiskas ķīmiskās vielas, piemēram, smagos metālus. Pavairošanas augsne pirms izmantošanas ir jāatbrīvo no faunas, trīs reizes to sasaldējot. Var izmantot arī tīru mākslīgo augsni, bet tādā gadījumā vairošanās ātrums varētu būt lēnāks salīdzinājumā ar ātrumu jauktos substrātos. Substrāta pH jābūt 6,0 ± 0,5. Kultūru tur inkubatorā 15 ± 2 °C temperatūrā bez gaismas. Katrā ziņā jāizvairās no temperatūras virs 23 °C. Mākslīgajai/dabīgajai augsnei jābūt mitrai, bet ne slapjai. Kad augsni maigi saspiež rokā, jāparādās mazām ūdens pilītēm. Noteikti jāizvairās no bezskābekļa apstākļiem (piemēram, ja izmanto vāku, vāka caurumu skaitam jābūt pietiekamam, lai nodrošinātu pietiekamu gaisa apmaiņu). Pavairošanas augsnei ir jānodrošina aerācija, to uzmanīgi apmaisot reizi nedēļā.

Tārpi ir jābaro vismaz reizi nedēļā *ad libitum* ar placinātām auzām, ko izvieto dobūmā uz augsnes virsmas un aplāj ar augsni. Ja tvertnē joprojām ir barība no iepriekšējās barošanas reizes, atbilstīgi jākorrigē barības deva. Ja uz atlikušās barības izveidojas pelējumsēnītes, tā jāaizvieto ar jaunu daudzumu placinātu auzu. Lai stimulētu vairošanos, placinātās auzas reizi divās nedēļās var papildināt ar tirdzniecībā pieejamu, vitamīniem bagātinātu olbaltumvielu pulveri. Pēc trijiem mēnešiem dzīvniekus pārvieto uz svaigi sagatavotu kultūru vai pavairošanas substrātu. Placinātās auzas, kas jāglabā hermētiski noslēgtos traukos, ir jāievieto autoklāvā vai jāuzkarsē pirms izmantošanas, lai izvairītos no infekcijām ar miltu ērcēm (piemēram, *Glycyphagus* sp., *Astigmata*, *Acarina*) vai plēsīgām ērcēm (piemēram, *Hypoaspis* (*Cosmolaelaps*) *miles*, *Gamasida*, *Acarina*). Pēc dezinfekcijas barību samai, lai to varētu viegli izkaisīt uz augsnes virsmas. Vēl par barību var izmantot maizes raugu vai zivju barību TetraMin®.

Kopumā kultivēšanas apstākļi ir pietiekami, ja tārpi necenšas pamest substrātu, ātri pārvietojas cauri augsnei, tiem ir spīdīga ārējā virsma, pie kuras nelip augsnes daļiņas, tie ir vairāk vai mazāk balti un ja ir redzami dažāda vecuma tārpi. Faktiski tārpus var uzskatīt par veselīgiem, ja tie nepārtraukti vairojas.

Atlasītas papildu atsauces

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."