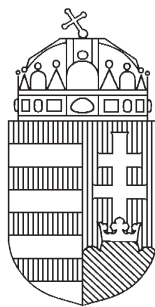


MAGYAR



KÖZLÖNY

A MAGYAR KÖZTÁRSASÁG HIVATALOS LAPJA

Budapest,
2005. november 29.,
kedd

154. szám
II. kötet

Ára: 2277,- Ft

TARTALOMJEGYZÉK

56/2005. (XI. 29.)
EüM-KvVM-BM e. r.

A veszélyes anyagok és a veszélyes készítmények tulajdonságainak vizsgálati módszereiről és a vizsgálatok eredményeinek értékeléséről szóló 54/2003. (IX. 1.) ESZCSM-KvVM-BM együttes rendelet módosításáról

II. rész JOGSZABÁLYOK

A Kormány tagjainak rendeletei

**Az egészségügyi miniszter,
a környezetvédelmi és vízügyi miniszter,
valamint a belügyminiszter
56/2005. (XI. 29.) EüM-KvVM-BM
együttes rendelete**

**a veszélyes anyagok és a veszélyes készítmények
tulajdonságainak vizsgálati módszereiről
és a vizsgálatok eredményeinek értékeléséről szóló
54/2003. (IX. 1.) ESZCSM-KvVM-BM
együttes rendelet módosításáról**

A kémiai biztonságról szóló 2000. évi XXV. törvény 34. §-a (4) bekezdésének c) pontjában kapott felhatalmazás alapján a következőket rendeljük el:

1. §

A veszélyes anyagok és a veszélyes készítmények tulajdonságainak vizsgálati módszereiről és a vizsgálatok eredményeinek értékeléséről szóló 54/2003. (IX. 1.) ESZCSM-KvVM-BM együttes rendelet (a továbbiakban: e.R.) melléklete a következők szerint módosul:

a) az „A” rész, Módszerek a fizikai tulajdonságok meghatározásához az 1. számú melléklet szerinti A.21. fejezetet egészül ki;

b) a „B” rész, Módszerek a toxikológiai tulajdonságok meghatározásához B.1. Akut toxicitás trisz (orális) – Akut toxicitási osztály módszer fejezet helyébe a 2. számú melléklet szövege lép;

c) a „B” rész, Módszerek a toxikológiai tulajdonságok meghatározásához B.1. Akut toxicitás bis (orális) – Fix dózis módszer fejezet helyébe a 3. számú melléklet szövege lép;

d) a „B” rész, Módszerek a toxikológiai tulajdonságok meghatározásához B.4. Akut toxicitás (bőrirritáció) fejezet helyébe a 4. számú melléklet szövege lép;

e) a „B” rész, Módszerek a toxikológiai tulajdonságok meghatározásához B.5. Akut toxicitás (szemirritáció) fejezet helyébe az 5. számú melléklet szövege lép;

f) a „B” rész, Módszerek a toxikológiai tulajdonságok meghatározásához B.31. Teratogenitási vizsgálat rágszálókon és nem-rágszálókon fejezet helyébe a 6. számú melléklet szövege lép;

g) a „B” rész, Módszerek a toxikológiai tulajdonságok meghatározásához B.35. Kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat fejezet helyébe a 7. számú melléklet szövege lép;

h) a „B” rész, Módszerek a toxikológiai tulajdonságok meghatározásához a 8. számú melléklet szerinti B.42. és B.43. fejezettel egészül ki;

i) a „C” rész, Az ökotoxicitás meghatározására szolgáló módszerek a 9. számú melléklet szerinti C.21–24. fejezetekkel egészül ki.

2. §

Az e.R. 2. §-ának (2) bekezdése helyébe a következő rendelkezés lép:

„(2) Ez a rendelet a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló, 1967. június 27-i 67/548/EGK tanácsi irányelv

– 84/449/EGK, 88/302/EGK, 92/69/EGK, 93/21/EGK, 96/54/EK, 98/73/EK, 2000/32/EK, 2000/33/EK, 2001/59/EK, 2004/73/EK irányelvekkel módosított – V. mellékletének való megfelelést szolgálja.”

3. §

(1) Ez a rendelet a kihirdetését követő 8. napon lép hatályba.

(2) Ez a rendelet a veszélyes anyagok osztályozására, csomagolására és címkézésére vonatkozó törvényi, rendeleti és közigazgatási rendelkezések közelítéséről szóló 67/548/EGK tanácsi irányelvnek a műszaki fejlődéshez történő huszonkilencedik hozzáigazításáról szóló, 2004. április 29-i 2004/73/EK tanácsi irányelvnek való megfelelést szolgálja.

Dr. Rácz Jenő s. k.,
egészségügyi miniszter

Dr. Persányi Miklós s. k.,
környezetvédelmi és vízügyi
miniszter

Dr. Lamperth Mónika s. k.,
belügyminiszter

1. számú melléklet az 56/2005. (XI. 29.) EüM–KvVM–BM együttes rendelethez**A.21. OXIDÁLÓ TULAJDONSÁGOK (FOLYADÉKOK)****1. MÓDSZER****1.1. Bevezetés**

Ezzel a vizsgálati módszerrel egy folyékony anyag azon képességét mérhetjük, hogy milyen mértékben képes egy éghető anyag égésének sebességét vagy intenzitását növelni, vagy olyan keveréket képezni egy éghető anyaggal, amely öngyulladásra képes, ha a két anyagot alaposan összekeverik. A módszer az oxidáló folyadékok vizsgálatára szolgáló ENSZ-módszeren (1) alapul, illetve egyenértékű azzal. Mivel azonban az A.21. módszer elsősorban arra szolgál, hogy kielégítse a 67/548 irányelv követelményeit, csak egyetlen referenciaanyaggal kell az összehasonlítást elvégezni. Más referenciaanyagok vizsgálatára és összehasonlítására akkor lehet szükség, ha a vizsgálatok eredményeit várhatóan más célokra használják fel¹.

Nem kell elvégezni ezt a vizsgálatot, ha a szerkezeti képlet alapján kétségtelenül megállapítható, hogy az anyag nem képes exoterm reakcióba lépni egy éghető anyaggal.

Hasznos, ha a vizsgálat elvégzése előtt rendelkezünk előzetes információkkal az anyag potenciális robbanásveszélyességi tulajdonságairól.

Nem alkalmazható a vizsgálat szilárd anyagokra, gázokra, robbanásveszélyes vagy erősen tűzveszélyes anyagokra vagy szerves peroxidokra.

Előfordulhat, hogy nem kell elvégezni ezt a vizsgálatot, ha az oxidáló folyadékok vizsgálatára szolgáló ENSZ-módszerrel (1) már megvizsgálták az anyagot, és rendelkezésre állnak ennek eredményei.

1.2. Fogalommeghatározások és egységek

»Átlagos nyomásemelkedési idő«: az a mért átlagos idő, amely alatt a vizsgált keverék nyomása a légköri nyomás felett 690 kPa-ról 2070 kPa-ra emelkedik.

1.3. Referenciaanyag

Referenciaanyagként 65 tömegszázalékos vizes salétromsav (analitikai minőségű) szükséges².

Adott esetben, ha a vizsgáló előre tudja, hogy a vizsgálat eredményeit végül más célokra használhatják³, célszerű lehet további referenciaanyagokat is megvizsgálni³.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálandó folyadékot 1:1 tömegarányban összekeverjük rostos cellulózzal és nyomástartó edénybe tesszük. Ha a keverés vagy betöltés során öngyulladás lép fel, nincs szükség további vizsgálatra.

Ha nem lép fel öngyulladás, az egész vizsgálatot el kell végezni. A keveréket a nyomástartó edényben hevíteni kell, majd meg kell mérni, hogy átlagosan mennyi idő szükséges ahhoz, hogy a nyomás a légköri nyomás felett 690 kPa-ról 2070 kPa-ra emelkedjen. Ezt kell azután összehasonlítani a referenciaanyag(ok) és cellulóz 1:1 arányú keverékével kapott átlagos nyomásemelkedési idővel.

1.5. Minőségi követelmények

Egyetlen anyagon elvégzett öt kísérletben egyik eredmény sem térhet el 30%-nál nagyobb mértékben a számtani átlagtól. Az átlaghoz képest 30%-nál nagyobb eltérést mutató eredményeket el kell vetni, tökéletesíteni kell a keverési és betöltési eljárást, majd meg kell ismételni a vizsgálatot.

¹ Ahogyan például az ENSZ szállítási rendeleteinek keretében.

² A savat a vizsgálat előtt titrálni kell annak érdekében, hogy ellenőrizzük a koncentrációját.

³ Pl. 50 w/w%-os perklórsav és 40 w/w%-os nátrium-klorát kerül használatra az (1) hivatkozásban.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. Előkészítés

1.6.1.1. Az éghető anyag

Éghető anyagként 50–250 m szálhosszúságú és 25 m⁴ átlagos szálátmérőjű száraz, rostos cellulózt kell használni. Maximum 25 mm vastag rétegben, 105 °C-on, 4 órán át, tömegállandóságig kell szárítani, majd lehűlésig, illetve felhasználásig nedvszívó anyag jelenlétében a szárítóberendezésben kell tartani. A száraz cellulóz víztartalmának a száraz tömeg 0,5%-a alatt kell lennie⁵. Ennek eléréséhez szükség esetén hosszabb szárítási időt kell alkalmazni⁶. A vizsgálat során ugyanazt a tétel cellulózt kell használni.

1.6.1.2. A berendezés

1.6.1.2.1. A nyomástartó edény

Szükség van egy nyomástartó edényre. Az edény henger alakú, acél nyomástartó edény, amelynek hossza 89 mm, külső átmérője pedig 60 mm (lásd az 1. ábrát). A két ellentétes oldalon sík felület van kialakítva (itt az edény keresztmetszeti mérete 50 mm-re csökken), amely megkönnyíti a kezelést, amikor becsavarják a gyújtódugót és a szellőződugót. Az edényen átmenő 20 mm átmérőjű furatot az egyik végén 19 mm mélységben kibővítik, és abba 1"-os csőmenetet (British Standard Pipe = BSP) vagy azzal egyenértékű metrikus menetet váganak. A nyomáselvezető, amely egy oldalág, a nyomástartó edény ívelt falába van becsavarozva, 35 mm-re az edény egyik végétől, és 90°-os szögben a megmunkált sík felülethez képest. Az erre a célra szolgáló menetes furat 12 mm mély, és 1/2"-os csőmenettel (vagy ezzel egyenértékű metrikus menettel) van ellátva az oldalág végén levő menetnek megfelelően. Ha szükséges, a gáztömörség érdekében egy inert tömítés is beilleszthető. A 6 mm átmérőjű átmenő furattal ellátott oldalág 55 mm-re nyúlik ki a nyomástartó edényből. Az oldalág végén a furat fel van bővítve, és csavarmenettel van ellátva membrános nyomásátalakító számára. Bármilyen nyomásmérő eszköz alkalmazható, feltéve, hogy ellenáll a forró gázoknak vagy bomlástermékeknek, és legfeljebb 5 ms alatt képes 690–2070 kPa nyomásemelkedést érzékelni.

A nyomástartó edénynek az oldalágtól távolabbi vége gyújtódugóval van lezárva, amelyben két elektróda van, amelyek közül az egyik szigetelve van a dugó testétől, a másik pedig azzal elektromosan érintkezik. A nyomástartó edény másik vége egy hasadótárcsával van lezárva (hasadó nyomása körülbelül 2200 kPa), amelyet egy 20 mm-es furattal ellátott rögzítődugó tart a helyén. Szükség esetén a gáztömörség biztosítására a gyújtódugóhoz inert tömítés alkalmazható. A használat során a szerelvényt egy állványzat (2. ábra) tartja megfelelő helyzetben. Ez általában egy 235 mm × 184 mm × 6 mm méretű lágyacél alaplapból és egy 185 mm hosszúságú 70 mm × 70 mm × 4 mm-es zárt szelvényből áll.

A zárt szelvény egyik végén a két szemben levő oldalból egy-egy szakaszt kivágnak úgy, hogy két lapos lábrész jöjjön létre, amely felett 86 mm hosszúságban megmarad az érintetlen zárt szelvény. Ezeknek a lapos részeknek a végét a zárt szelvény hossz tengelyéhez képest 60°-os szögben levágnak és az alaplaphoz hegesztik. A zárt szelvény felső végén az egyik oldalba 22 mm széles és 46 mm mély hornyot váganak úgy, hogy ha a nyomástartó edény szerelvényt a gyújtódugóval lefelé a zárt szelvénybe behelyezik, az oldalág a horonyba illeszkedik. Távtartóként 30 mm széles és 6 mm vastag acéldarabot hegesztenek a zárt szakasz alul levő belső felületére. Két ellentétes oldalon egy-egy 7 mm-es füles csavar rögzíti a nyomástartó edényt a helyén. Egy-egy 12 mm széles és 6 mm vastag acélszalag van hozzáhegesztve a két lapos lábhoz a zárt szakasz alsó végénél, amely a nyomástartó edényt alulról támasztja meg.

1.6.1.2.2. A gyújtórendszer

A gyújtórendszer 25 cm hosszú, 0,6 mm átmérőjű és 3,85 ohm/m ellenállású Ni/Cr huzalból áll. A huzalt egy 5 mm átmérőjű rúd segítségével tekercs alakúra kell csavarni, és a gyújtódugóban lévő elektródákhoz kell kapcsolni. A tekercset a 3. ábrán bemutatottak valamelyikének megfelelően kell kialakítani. Az edény alja és a gyújtótekercs alja közötti távolságnak 20 mm-nek kell lennie. Ha az elektródák nem állíthatók, a gyújtóhuzalnak a tekercs és az edény alja közötti végeit kerámiaköppennyel kell szigetelni. A huzalt egy legalább 10 A-t szolgáltató állandó áramú tápegységgel kell fűteni.

1.6.2. A vizsgálat elvégzése⁷

A nyomásátalakító és a fűtőrendszer felszerelése után, de még a hasadótárcsa behelyezése előtt, a berendezést úgy kell tartani, hogy a gyújtódugó alul legyen. Egy üveg főzőpohárban egy keverőbot segítségével a vizsgálandó folyadékból 2,5 g-ot össze kell keverni 2,5 g száraz cellulózzal⁸. Biztonsági okokból a keverést úgy kell végezni, hogy a vizsgálatot végző személy és a keverék között legyen egy biztonsági védőlemez. Ha a keverék a keverés vagy betöltés során meggyullad, nincs szükség további vizsgálatokra. A keveréket kisebb adagokban és ütogetve a nyomástartó edénybe kell tölteni, vigyázva arra, hogy a keverék a gyújtótekercs körül gyűljön össze és megfelelően érintkezzen azzal. Fontos, hogy a betöltés során a tekercs ne torzuljon, mivel ez hibás eredményekhez vezethet⁹. Ezt követően be kell tenni a hasadótárcsát a helyére, majd szorosan be kell csavarni a tartódugót. A megtöltött edényt a hasadótárcsával felfelé a robbantó áll-

⁴ Pl. Whatman Column Chromatographic Cellulose Powder CF 11, katalógusszám: 4021 050.

⁵ (Pl.) Karl-Fisher titrálással ellenőrizve.

⁶ Ez a víztartalom szintén elérhető (pl.) 24 órás 105 °C-on vákuum alatt történő melegítéssel.

⁷ Az oxidálószeres cellulózzal készített keverékeit potenciálisan robbanásveszélyesnek kell tekinteni, és ennek megfelelő óvatossággal kell kezelni.

⁸ A gyakorlatban ez úgy érhető el, hogy a vizsgálandó folyadékból és a cellulózból a kísérlethez szükségesnél nagyobb mennyiségben készítjük el az 1:1 arányú keveréket, majd 5 ± 0,1 g-ot teszünk belőle a nyomástartó edénybe. A keveréket minden egyes kísérlethez frissen kell elkészíteni.

⁹ Különösen kerülni kell, hogy a tekercs egymással szomszédos menetei egymáshoz érjenek.

ványra kell helyezni, amelyet egy megfelelő, fémborítású füstkamrában vagy robbantókamrában kell elhelyezni. Az áramforrást a gyújtódugó külső csatlakozóihoz kell kapcsolni, és 10 A áramot kell rákapcsolni. A keverés megkezdése és az áram bekapcsolása között nem telhet el 10 percnél hosszabb idő.

A nyomásátalakító által létrehozott jelet megfelelő rendszerrel rögzíteni kell, amely lehetővé teszi mind az eredmény kiértékelését, mind pedig a nyomás változásának folyamatos rögzítését az idő függvényében (pl. egy szalagos íróműszerhez kapcsolt tranzien্স íróműszer). A keveréket addig kell hevíteni, amíg a hasadótárcsa el nem törik, vagy legalább 60 másodpercig. Ha a hasadótárcsa nem törik el, meg kell várni, amíg a keverék lehűl, majd a megfelelő óvintézkedések betartásával, az esetleges nyomásnövekedésre számítva, óvatosan szét kell szerelni a berendezést. A vizsgálandó anyaggal és a referenciaanyaggal vagy referenciaanyagokkal is öt kísérletet kell végezni. Fel kell jegyezni azt az időt, amely alatt a nyomás a légköri nyomás felett 690 kPa-ról 2070 kPa-ra emelkedik. Ki kell számítani az átlagos nyomásemelkedési időt.

Bizonyos esetekben az anyagok olyan (vagy túl magas vagy túl alacsony) nyomásemelkedést idézhetnek elő, amelyet nem az anyag oxidáló tulajdonságait jellemző kémiai reakciók okoznak. Ilyen esetekben szükség lehet arra, hogy a vizsgálatot cellulóz helyett egy inert anyaggal, pl. kovafölddel megismételjük, és így tisztázzuk a reakció jellegét.

2. ADATOK

Nyomásemelkedési idő mind a vizsgálandó anyag, mind a referenciaanyag(ok) esetében.

Nyomásemelkedési idő az inert anyaggal végzett vizsgálat esetén, ha ilyen is történt.

2.1. Az eredmények kezelése

Mind a vizsgálandó anyag, mind a referenciaanyag(ok) esetében ki kell számítani az átlagos nyomásemelkedési időt.

Ki kell számítani az átlagos nyomásemelkedési időt az inert anyaggal végzett vizsgálat esetén (ha ilyen is történt).

Az 1. táblázatban a kapott eredményekre láthatunk példát.

1. táblázat

Példák az eredményekre^d

Anyag ^c	Átlagos nyomásemelkedési idő cellulózzal készített 1:1 arányú keverékben (ms)
Ammónium-dikromát, telített vizes oldat	20 800
Kalcium-nitrát, telített vizes oldat	6 700
Vas(III)-nitrát, telített vizes oldat	4 133
Lítium-perklorát, telített vizes oldat	1 686
Magnézium-perklorát, telített vizes oldat	777
Nikkel-nitrát, telített vizes oldat	6 250
Salétromsav, 65%	4 767 ^a
Perklórsav, 50%	121 ^a
Perklórsav, 55%	59
Kálium-nitrát, 30%-os vizes oldat	26 690
Ezüst-nitrát, telített vizes oldat	— ^b
Nátrium-klorát, 40%-os vizes oldat	2 555 ^a
Nátrium-nitrát, 45%-os vizes oldat	4 133
Inert anyag	
Víz : cellulóz	— ^b

^a Laboratóriumok közötti összehasonlító vizsgálatokból kapott átlagérték.

^b Nem érte el a 2070 kPa-os maximális nyomást.

^c A telített oldatokat 20 °C-on kell elkészíteni.

^d Az ENSZ szállítási rendszer szerinti osztályozást lásd az (1) hivatkozásban.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

- a vizsgált anyag neve, összetétele, tisztasága stb.;
- a vizsgált anyag koncentrációja;
- a cellulóz szárítására alkalmazott módszer;
- az alkalmazott cellulóz víztartalma;

- a mérések eredményei;
- az inert anyaggal kapott vizsgálatok eredményei, ha történt ilyen;
- a számított átlagos nyomásemelkedési idők;
- az ettől a módszertől való bármely eltérés és annak okai;
- az eredmények értékelése szempontjából lényeges összes egyéb információ;

3.2. Az eredmények értelmezése¹⁰

A vizsgálatok eredményeit a következők alapján kell értelmezni:

- a vizsgált anyagból és cellulózból készített keverékben fellép-e öngyulladás; és
- a nyomásnak a légköri nyomás felett 690 kPa-ról 2070 kPa-ra való emelkedéséhez szükséges átlagos idő összehasonlítása a referenciaanyag(ok) esetén mért értékekkel.

Oxidáló hatásúnak kell tekinteni egy folyékony anyagot, ha:

- cellulózzal alkotott 1:1 tömegarányú keverékében öngyulladás lép fel; vagy
- cellulózzal alkotott 1:1 tömegarányú keverékében az átlagos nyomásemelkedési idő kisebb vagy egyenlő a 65 tömegszázalékos vizes salétromsav és cellulóz 1:1 tömegarányú keverékében mérttel.

A téves pozitív eredmények elkerülése érdekében az eredmények értelmezésekor szükség esetén figyelembe kell venni a folyadék inert anyaggal történő vizsgálatok kapott eredményeket is.

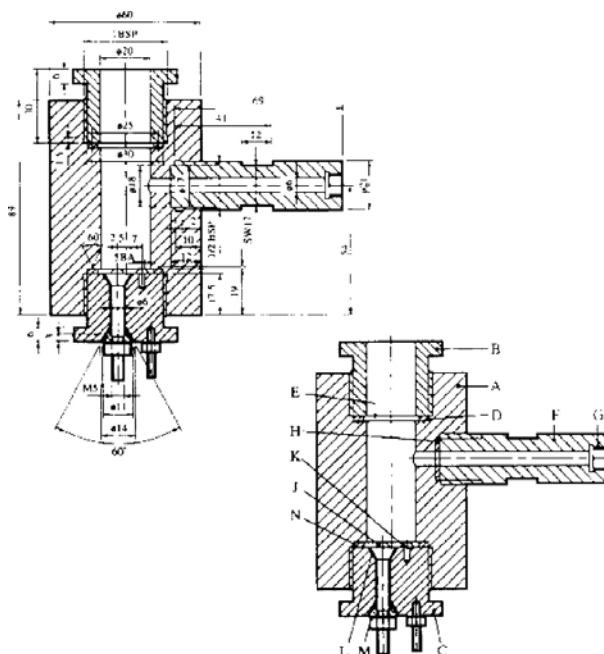
¹⁰ Az ENSZ szállítási rendeletek szerinti, több referenciaanyaggal mért eredmények értelmezéséhez lásd az (1) hivatkozást.

4. HIVATKOZÁSOK

(1) „Ajánlások a veszélyes áruk szállítására, Vizsgálatok és kritériumok kézikönyv” harmadik javított kiadása, az ENSZ kiadvány száma: ST/SG/AC.10/11/Rev.3), 1999. 342. oldal, O.2 vizsgálat: oxidáló folyékony anyagok vizsgálata.

1. ábra

A nyomástartó edény

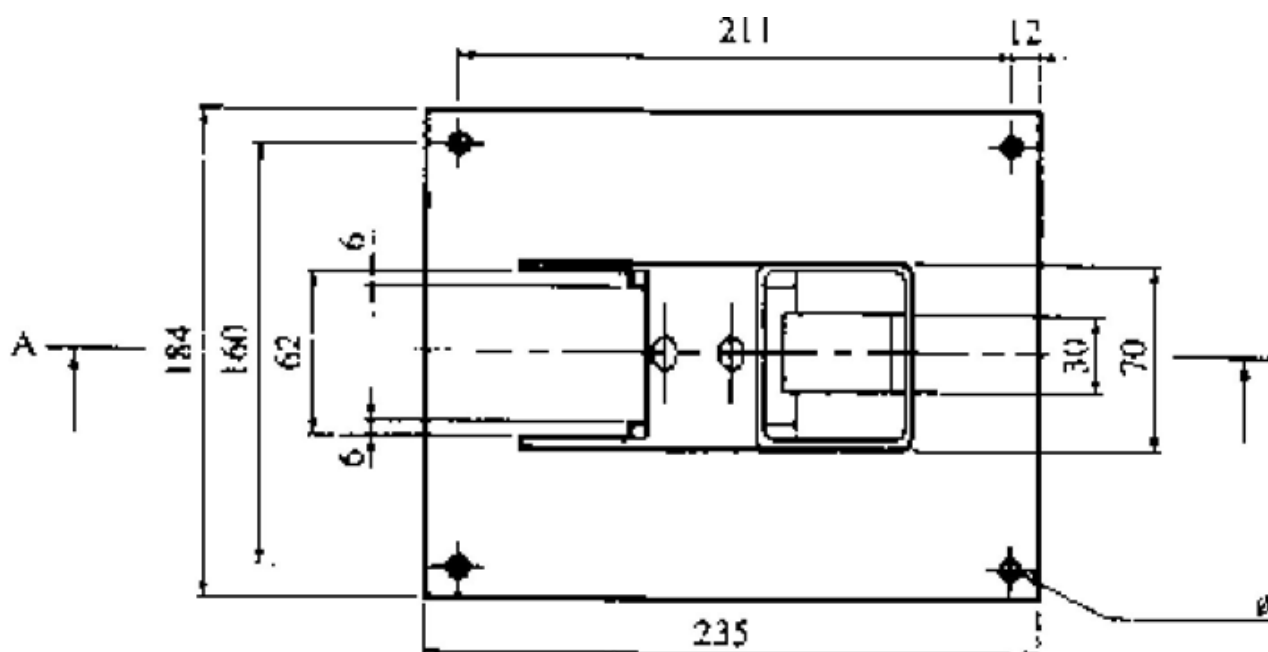


- (A) A nyomástartó edény háza
(D) Lágyólm alátétlemez
(G) Nyomásátalakító fej
(K) Földelt elektróda
(N) Horony a tömítőgyűrű részére

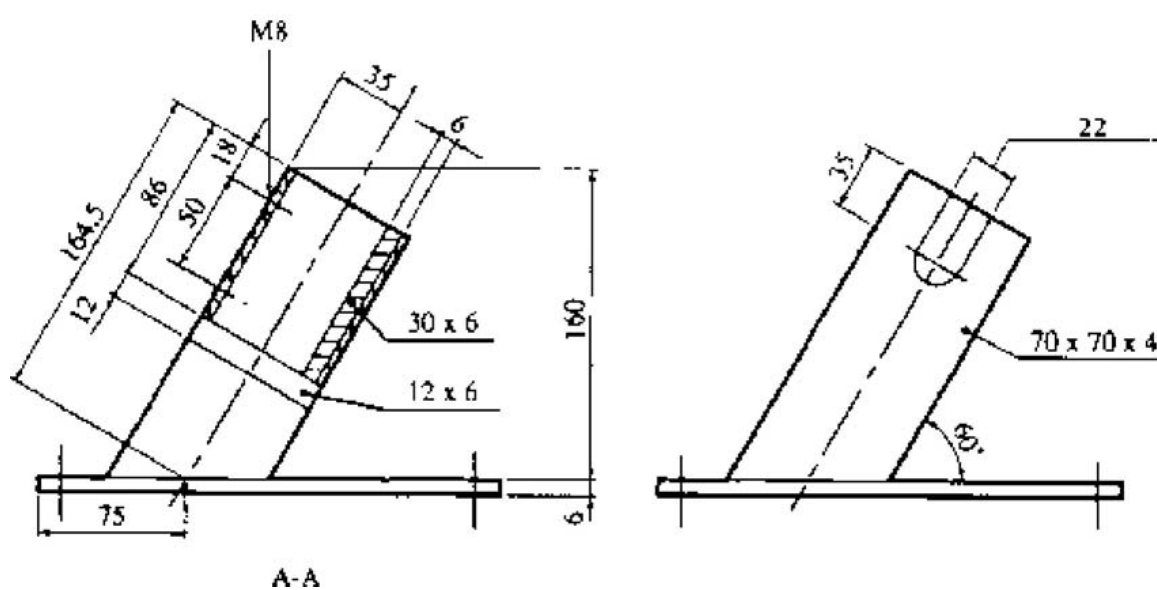
- (B) A hasadótárcsát tartó dugó
(E) Hasadótárcsa
(H) Alátétlemez
(L) Szigetelés

- (C) Gyújtódugó
(F) Oldalág
(J) Szigetelt elektróda
(M) Acélkúp

2. ábra

Az állványzat

3. ábra

A gyújtórendszer

(A) Gyújtótekerecs (B) Szigetelés (C) Elektródák (D) Gyújtódugó

Megjegyzés: a fenti elrendezések bármelyike alkalmazható.

2. számú melléklet az 56/2005. (XI. 29.) EüM–KvVM–BM együttes rendelethez**B.1c. AKUT ORÁLIS TOXICITÁS – AKUT TOXIKUS OSZTÁLY MÓDSZER****1. MÓDSZER**

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 423 (2001) módszerrel.

1.1. Bevezetés

Az itt ismertetett akut toxikus osztály módszer (1) egy lépcsőzetes eljárás, amelyben lépésenként három azonos ivarú állatot használnak. Az elhullási aránytól és/vagy az állatok elhullásközei állapotától függően átlagosan 2–4 lépésre lehet szükség a vizsgálandó anyag akut toxicitásának megítéléséhez. Az eljárás reprodukálható, nagyon kevés állatot kell használni hozzá, és hasonló módon lehet vele minősíteni az anyagokat, mint a többi akut toxicitás vizsgálati módszerrel. Az akut toxikus osztály módszer rögzített dózisokkal végzett biometria vizsgálatokon (2) (3) (4) (5) alapul, amelyek megfelelően el vannak választva egymástól, hogy lehetővé tegyék az anyag besorolási és veszélyfelmérési célokra történő minősítését. Az 1996-ban jóváhagyott módszert széles körben validálták a szakirodalomból vett *in vivo* LD₅₀-adatokkal szemben mind nemzeti (6), mind pedig nemzetközi (8) szinten.

Arról, hogy egy adott célra melyik a legmegfelelőbb vizsgálati módszer, az Akut Orális Toxicitási Vizsgálatok Útmutatójában (8) található iránymutatás. Ez az útmutató további információkat is tartalmaz a B.1c. vizsgálati módszer alkalmazásával és értelmezésével kapcsolatosan.

Nincs szükség a vizsgálandó anyagok olyan dózisokban történő alkalmazására, amelyek korróziós vagy súlyosan irritáló hatásuk miatt kifejezett fájdalmat vagy szorongást okoznak. Az elhullásközei állapotban lévő állatokat vagy azokat, amelyek nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködnek, vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutatják, humánus módon euthanizálni kell, és ugyanúgy kell figyelembe venni őket az eredmények értelmezésekor, mint azokat az állatokat, amelyek elhullottak a vizsgálatok során. A megjósolható vagy közei elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok euthanizálására vonatkozó döntési kritériumok egy másik útmutatóban (9) találhatók.

A módszer előre meghatározott dózisok alkalmazásán alapul, és a kapott eredmények lehetővé teszik, hogy az anyagot az akut toxicitást okozó anyagok besorolására szolgáló Vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének egyetemes harmonizált rendszere (GHS) szerint minősítsük és soroljuk be (10).

A módszer elvben nem alkalmas az LD₅₀ pontos kiszámítására, de lehetővé teszi azoknak az expozíciós tartományoknak a meghatározását, amelyeknél letalitás várható, mivel a fő végpont ebben a vizsgálatban is az állatok egy részének elhullása. Ez a módszer csak akkor teszi lehetővé az LD₅₀-érték meghatározását, ha legalább két dózis 0%-nál magasabb, de 100%-nál alacsonyabb elhullási arányt eredményez. A vizsgálandó anyagtól függetlenül az előre meghatározott dózisok alkalmazása és a kifejezetten a különféle állapotokban megfigyelt állatok számához kötődő besorolás növeli a laboratóriumok által készített jelentések egységességét és a vizsgálatok ismételhetőségét.

A vizsgáló laboratóriumnak a vizsgálat elvégzése előtt a vizsgálandó anyaggal kapcsolatos minden rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie. Ilyen információk az anyag megjelölése és kémiai szerkezete; fizikai-kémiai tulajdonságai; bármely más, az anyaggal elvégzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálat eredményei; szerkezetileg rokon anyagok toxikológiai adatai; valamint az anyag várható alkalmazása(i). Ezekre az információkra azért van szükség, hogy minden érintett meggyőződjön arról, hogy a vizsgálat releváns az emberi egészség védelme szempontjából, és elősegíti majd a legmegfelelőbb kezdődózis kiválasztását.

1.2. Fogalommeghatározások

»Akut orális toxicitás«: a vizsgálandó anyag egyszeri vagy 24 órán belül többszöri dózisának szájon át történő beadását követően jelentkező káros hatások.

»Késleltetett elhullás«: egy állat 48 órán belül nem hull el vagy nem tűnik elhullásközei állapotban lévőnek, de később, a 14 napos megfigyelési időszak során elpusztul.

»Dózis«: a vizsgálandó anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgálandó anyagnak a kísérleti állatok testtömeg-egységére számított tömegében (mg/kg) fejezik ki.

»GHS«: Vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének egyetemes harmonizált rendszere. Az OECD (emberi egészség és környezet), az ENSZ Veszélyes Anyagok Szállításának Szakértői Bizottsága (fizikai-kémiai tulajdonságok) és az ILO (veszély nyilvánosságra hozatala) közös tevékenysége, amelyet a Szervezetek Közötti Program a Vegyi Anyagok Helyes Kezelésére (IOMC) koordinál.

»Közei elhullás«: amikor a legközelebbi tervezett megfigyelés időpontja előtt elhullásközei állapot kialakulása vagy elhullás várható. Rágcsálók esetében erre utaló jelek lehetnek a görcsök, az oldalhelyzet, a fekvőhelyzet és a remegés. [A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (9)].

»LD₅₀ (közepes letális orális dózis)«: a vizsgálandó anyag statisztikailag levezetett egyszeri olyan dózisa, amely orálisan beadva az állatok 50%-ának elhullását okozza. Az LD₅₀-értéket a vizsgálandó anyagnak a kísérleti állatok testtömeg-egységére számított tömegében (mg/kg) fejezik ki.

»Határdózis«: egy, a vizsgálhatóság felső határánál lévő dózis (2000 vagy 5000 mg/kg).

»Elhullásközel állapota«: az esetleges kezelés ellenére is elhullás közelében lévő állapot vagy túlélésre való képtelenség. [A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (9)].

»Megjósolható elhullás«: a kísérlet tervezett vége előtt, a jövőben egy ismert időpontban való elhullásra utaló klinikai tünetek megléte, például: a víz vagy az élelem elérésére való képtelenség. [A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (9)].

1.3. A vizsgálat elve

A vizsgálat alapelve, hogy a lépésenként minimális számú állatot alkalmazó lépcsőzetes eljárás alapján elegendő információ nyerhető a vizsgálandó anyag akut toxicitásáról ahhoz, hogy be lehessen azt sorolni. Az anyagot szájon át és a meghatározott dózisok egyikét alkalmazva adják be a kísérleti állatok egy csoportjának. Az anyagot lépcsőzetes eljárással vizsgálják, ahol minden lépésben három azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak. A kezelt állatokban az anyaggal összefüggő elhullás vagy annak hiánya határozza meg a következő lépést, azaz:

- nincs szükség további vizsgálatra,
- további három állat vizsgálata történik ugyanazzal a dózissal,
- további három állat vizsgálata történik a következő nagyobb vagy kisebb dózissal.

A vizsgálati eljárás további részletei az 1. mellékletben találhatók. A módszer alkalmazásával döntést lehet hozni arról, hogy a vizsgálandó anyag a rögzített LD₅₀-határértékek segítségével megállapított toxicitási osztályok melyikébe sorolható be.

1.4. A módszer ismertetése

1.4.1. Az állatfaj kiválasztása

A preferált rágcsálófaj a patkány, bár más rágcsálófajok is alkalmazhatók. Általában nőstényeket használnak (9). Ennek az az oka, hogy a hagyományos LD₅₀-vizsgálatokra vonatkozó szakirodalom áttekintése alapján általában kicsi a különbség a nemek érzékenysége között, de azokban az esetekben, amikor megfigyelhető különbség, a nőstények általában valamivel érzékenyebbek (11). Azonban ha a szerkezetileg rokon vegyületek toxikológiai vagy toxikokinetikai tulajdonságaival kapcsolatos adatok szerint a hímek nagyobb érzékenysége valószínűsíthető, akkor hímeket kell alkalmazni. Megfelelően meg kell indokolni, ha a vizsgálatot hímekkel végzik.

Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell alkalmazni. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az adagolás megkezdésekor az állatoknak 8–12 hetesnek kell lenniük, és testtömegük nem térhet el $\pm 20\%$ -nál többel az esetlegesen korábban kezelt állatok testtömegének átlagától.

1.4.2. Az állatok tartásának és etetésének körülményei

A kísérleti állatokat 22 °C (± 3 °C) hőmérsékletű helyiségben kell tartani. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30%-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70%-ot, a célértékek 50 és 60% között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. Az állatokat lehet vizsgált dózisonként egy ketrecben tartani, de az egy ketrecben lévő állatok számát úgy kell megválasztani, hogy az ne zavarja az egyes állatok megfigyelését.

1.4.3. Az állatok előkészítése

Az állatokat véletlenszerűen kell kiválasztani, majd egyedi azonosítóval kell ellátni, és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben kell tartani őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.4. A dózisok előkészítése

A vizsgálandó anyagokat általában a vizsgálandó dózistartományon belül állandó térfogatban kell beadni úgy, hogy a dóziskészítmény koncentrációját változtatják. Ha azonban egy folyékony végterméket vagy keveréket vizsgálnak, a vizsgálatot követő kockázatértékelés szempontjából megfelelőbb lehet, ha a vizsgálandó anyagot hígítatlanul, azaz állandó koncentrációban alkalmazzák, illetve egyes hatóságok ezt írják elő. A maximálisan beadható dózistérfogatot azonban egyik esetben sem szabad túllépni. Az, hogy egyszerre maximálisan mekkora térfogatú folyadékot lehet beadni, a kísérleti állat méretétől függ. Rágcsálók esetében a térfogat általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömeg-arányt: vizes oldatok esetében azonban 2 ml/100 g testtömeg-arány is megfontolható. A dóziskészítmény formulázása tekintetében – ahol lehet – a vizes oldatok/szuszpenziók/emulziók alkalmazása javasolt, másodsorban az olajos (pl. kukorica-csira-olajban elkészített) oldatok/szuszpenziók/emulziók, és harmadsorban esetlegesen más vivőanyagokban elkészített oldatok. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A dózisokat a beadás

előtt rövid idővel kell elkészíteni, kivéve, ha ismert és igazoltan elfogadható a készítmény stabilitása az alatt az alkalmazás időtartama alatt.

1.5. Eljárás

1.5.1. A dózisok beadása

A vizsgálandó anyagot egyetlen dózisban, gyomorszondán vagy egy megfelelő intubációs kanülön át történő táplálással kell beadni. Abban a rendkívüli esetben, ha nem lehetséges egyetlen dózist alkalmazni, a dózis egy 24 órát nem meghaladó időtartam alatt kisebb részletekben is beadható.

A kezelés előtt az állatokat éheztetni kell (pl. patkány esetében egy éjszakán át meg kell vonni a táplálékot, de a vizet nem; egér esetében 3–4 órára kell megvonni a táplálékot, de a vizet nem). A koplaltatási időszakot követően meg kell mérni az állatok testtömegét, majd be kell adni a vizsgálandó anyagot. Az anyag beadása után a táplálékot újra meg lehet vonni – patkány esetében 3–4 órára, egér esetében 1–2 órára. Ha egy dózist részletekben adnak be, a beadás időtartamától függően menet közben szükség lehet arra, hogy az állatoknak táplálékot és vizet adjanak.

1.5.2. Az állatok száma és a dózisok

Minden lépésben három állatot kell alkalmazni. A kezdődóvizist az 5, 50, 300 és 2000 mg/testtömeg-kg-os négy rögzített dózis közül kell kiválasztani. Azt a dózist kell kezdődóvizisként kiválasztani, amelyiknél a legvalószínűbb, hogy a kezelt állatok egy részénél elhullást okoz. Az 1. mellékletben látható folyamatábrák ismertetik az egyes kezdődóvizisok esetén követendő eljárást. A 4. melléklet pedig azzal kapcsolatosan ad iránymutatást, hogy a Vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének egyetemes harmonizált rendszere (GHS) bevezetéséig hogyan kell az EU-rendszer szerint elvégezni a besorolást.

Ha a rendelkezésre álló információ alapján a legmagasabb kezdődóvizis (2000 mg/testtömeg-kg) valószínűleg nem okoz elhullást, akkor határérték-vizsgálatot kell végezni. Ha a vizsgálandó anyagról nincs információ, állatjóléti okokból a 300 mg/testtömeg-kg-os kezdődóvizis alkalmazása javasolt.

Az egyes dózisok vizsgálata közötti időtartamot a mérgezési tünetek megjelenésének időpontja, időtartama és súlyossága határozza meg. Az állatok következő dózissal történő kezelését nem szabad megkezdeni mindaddig, amíg meg nem győződnek arról, hogy az előzőleg kezelt állatok életben maradnak.

Kivételes esetben és kizárólag akkor, ha konkrét szabályozási hatósági követelmények indokolják, megfontolás tárgyává lehet tenni egy további, 5000 mg/kg-os felső dózis alkalmazását (lásd a 2. mellékletet). Az állatok kímélete érdekében a GHS 5. kategóriában (2000–5000 mg/kg) nem ajánlott állatokkal kísérletezni, és csak abban az esetben szabad ilyen tervezni, ha nagy a valószínűsége, hogy egy ilyen vizsgálat eredményei közvetlen jelentőséggel bírnak az emberi vagy állati egészség vagy a környezet védelme szempontjából.

1.5.3. Határérték-vizsgálat

Határérték-vizsgálatot elsősorban olyan helyzetekben kell végezni, ha a kísérletet végzőnek olyan információi vannak, amelyek szerint a vizsgálandó anyag valószínűleg nem toxikus, azaz csak a hatósági határérték-dózisok felett toxikus. A vizsgálandó anyag toxicitásával kapcsolatban információ hasonló vegyületek vagy keverékek vagy termékek vizsgálataiból szerezhető, figyelembe véve a toxikológiai szempontból fontos komponenseket, illetve azok százalékos arányát. Olyan esetekben, ha kevés az anyag toxicitásával kapcsolatos információ, vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, vagy ha a vizsgálandó anyag várhatóan toxikus, a fő vizsgálatot kell elvégezni.

Végezhető határérték-vizsgálat egyetlen, 2000 mg/testtömeg-kg-os dózissal, összesen hat (lépésenként három-három) állat alkalmazásával. Kivételes esetben végezhető határérték-vizsgálat egyetlen, 5000 mg/kg-os dózissal is, amikor összesen három állatot alkalmaznak (lásd a 2. mellékletet). A vizsgálandó anyaggal összefüggő elhullás esetén szükséges lehet a következő alacsonyabb dózissal tovább folytatni a vizsgálatokat.

1.6. Megfigyelések

Az állatokat a dózis beadása után egyedileg kell megfigyelni, legalább az első 30 percen, azután az első 24 órában rendszeres időközönként, amelynek során különös figyelemmel kell őket kísérni az első 4 órában, majd ezt követően naponta, összesen 14 napon át, kivéve, ha az állatot állatjóléti okok miatt ki kell venni a vizsgálatból, és humánus módon exterminálni kell, vagy ha az állat elhullik. A megfigyelés időtartamát azonban nem szabad mereven meghatározni. Ezt a mérgezési reakciók, illetve a gyógyulás kezdete és időtartama alapján kell meghatározni, és ilyen módon szükség esetén meg lehet hosszabbítani. Fontos a mérgezési tünetek megjelenésének, illetve megszűnésének időpontja, különösen, ha a mérgezési tünetek inkább késleltetve jelentkeznek (12). Minden megfigyelést szisztematikusan rögzíteni kell úgy, hogy minden állat esetében önálló adatsort kell felvenni.

Ha a mérgezési tünetek tartósak, további megfigyelésekre van szükség. Meg kell figyelni a bőr és a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák, valamint a légzési és a keringési rendszer, az autonóm és a központi idegrendszer, illetve a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési mintázatok változásait. Figyelemmel kell lenni remegés, görcsök, nyáladás, hasmenés, letargia, alvás és kóma előfordulására is. A Humane Endpoints Guidance Documentben összefoglalt alapelveket és követelményeket is figyelembe kell venni (9). Humánus módon exterminálni kell az elhullásközeli állapotban lévő álla-

tokat, illetve azokat, amelyek súlyos fájdalom vagy tartós szorongás jeleit mutatják. Ha az állatokat humánus okok miatt exterminálni kell, vagy elhullanak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját is.

1.6.1. Testtömeg

Röviddel a vizsgálandó anyag beadása előtt és legalább egy héttel utána minden állat testtömegét egyenként meg kell mérni. A testtömeg-változást ki kell számítani, és rögzíteni kell. A vizsgálat végén az életben maradt állatokat újra meg kell mérni, majd humánus módon exterminálni kell őket.

1.6.2. Kórbonctani vizsgálat

Minden kísérleti állatot makroszkópos boncolásnak kell alávetni (azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt ki kellett venni a vizsgálatból). Minden egyes állat esetében minden makroszkópos kórtani elváltozást fel kell jegyezni. A kezdődózis beadása után legalább 24 óráig túlélő állatok esetében tervbe lehet venni a makroszkópos kórtani elváltozást mutató szervek mikroszkópos vizsgálatát is, mivel abból hasznos információk nyerhetők.

2. ADATOK

Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett az összes adatot táblázatos formában is össze kell foglalni úgy, hogy minden vizsgálati csoportra vonatkozóan mutassa a csoportban lévő kísérleti állatok számát, valamint azoknak a számát, amelyeknél mérgezési tünetek láthatók, amelyek a vizsgálat során elhullottak, vagy amelyeket humánus módon extermináltak, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek megfelelő módon a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

- fizikai megjelenés, tisztaság és ha releváns, a fizikai-kémiai tulajdonságok (ezen belül az izomerizáció is);
- azonosító adatok, ezen belül a CAS-szám.

Vivőanyag (ha szükséges):

- ha a vivőanyag nem víz, akkor ennek indoklása.

Kísérleti állatok:

- az alkalmazott faj/törzs;
- az állatok mikrobiológiai státusza, feltéve, hogy ismert;
- az állatok száma, életkora és ivara (ezen belül adott esetben annak indoklása, hogy nőtények helyett miért hímekeztetett);

- az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.;

kísérleti körülmények:

- a vizsgálandó anyag formulázására vonatkozó információk, ezen belül a beadott anyag fizikai formájával kapcsolatos adatok;
- a vizsgálandó anyag beadására vonatkozó információk, ezen belül a beadott térfogat és a beadás időpontja;
- a táplálék és a víz minősége (ezen belül a takarmány típusa/forrása, a víz forrása);
- a kezdődózis kiválasztásának indoklása.

Eredmények:

- a válaszadatok és a dózisok táblázatos formában történő megadása minden egyes állatra vonatkozóan (azaz a mérgezési tüneteket mutató, ezen belül elhullt állatokra; a hatások jellege, súlyossága és időtartama);
- a testtömeg-adatok és a testtömeg-változások táblázatos formában történő megadása;
- az egyes állatok testtömege a dózis beadásának napján, azt követően hetente, valamint az elhullás vagy exterminálás időpontjában;
- a tervezett exterminálás előtti elhullás napja és ideje;
- a mérgezési tünetek megjelenése és időbeli lefolyása, valamint esetleges visszafordíthatósága minden egyes állatra vonatkozóan;
- a boncolások és adott esetben a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan.

Az eredmények diszkussziója és értelmezése.

Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

- (1) Roll R., Höfer-Bosse Th. And Kayser D. (1986). New Perspectives in Acute Toxicity Testing of Chemicals. *Toxicol. Lett., Suppl.* 31, 86.
- (2) Roll R., Riebschläger M., Mischke U. and Kayser D. (1989). Neue Wege zur Bestimmung der akuten Toxizität von Chemikalien. *Bundesgesundheitsblatt* 32, 336–341.
- (3) Diener W., Sichha L., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1994). The Biometric Evaluation of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 68, 559–610.
- (4) Diener W., Mischke U., Kayser D. and Schlede E. (1995). The Biometric Evaluation of the OECD Modified Version of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 729–734.
- (5) Diener W., and Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alterations to LD/LC50 Tests. *ALTEX* 16, 129–134.
- (6) Schlede E., Mischke U., Roll R. and Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method – An Alternative to the LD₅₀ Test. *Arch. Toxicol.* 66, 455–470.
- (7) Schlede E., Mischke U., Diener W. and Kayser D. (1994). The International Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method (Oral). *Arch. Toxicol.* 69, 659–670.
- (8) OECD (2001) Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.
- (9) OECD (2000) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N 19.
- (10) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System For Human Health And Environmental Effects Of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p. 11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>]
- (11) Lipnick R L, Cotruvo, J A, Hill R N, Bruce R D, Stitzel K A, Walker A P, Chu I; Goddard M, Segal L, Springer J A and Myers R C (1995) Comparison of the Up-and Down, Conventional LD₅₀, and Fixed Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol* 33, 223–231.
- (12) Chan P.K. and A.W. Hayes. (1994). Chap. 16. Acute Toxicity and Eye Irritancy. Principles and Methods of Toxicology. Third Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd., New York, USA.

1. melléklet

Az egyes kezdődózisok esetében követendő eljárás

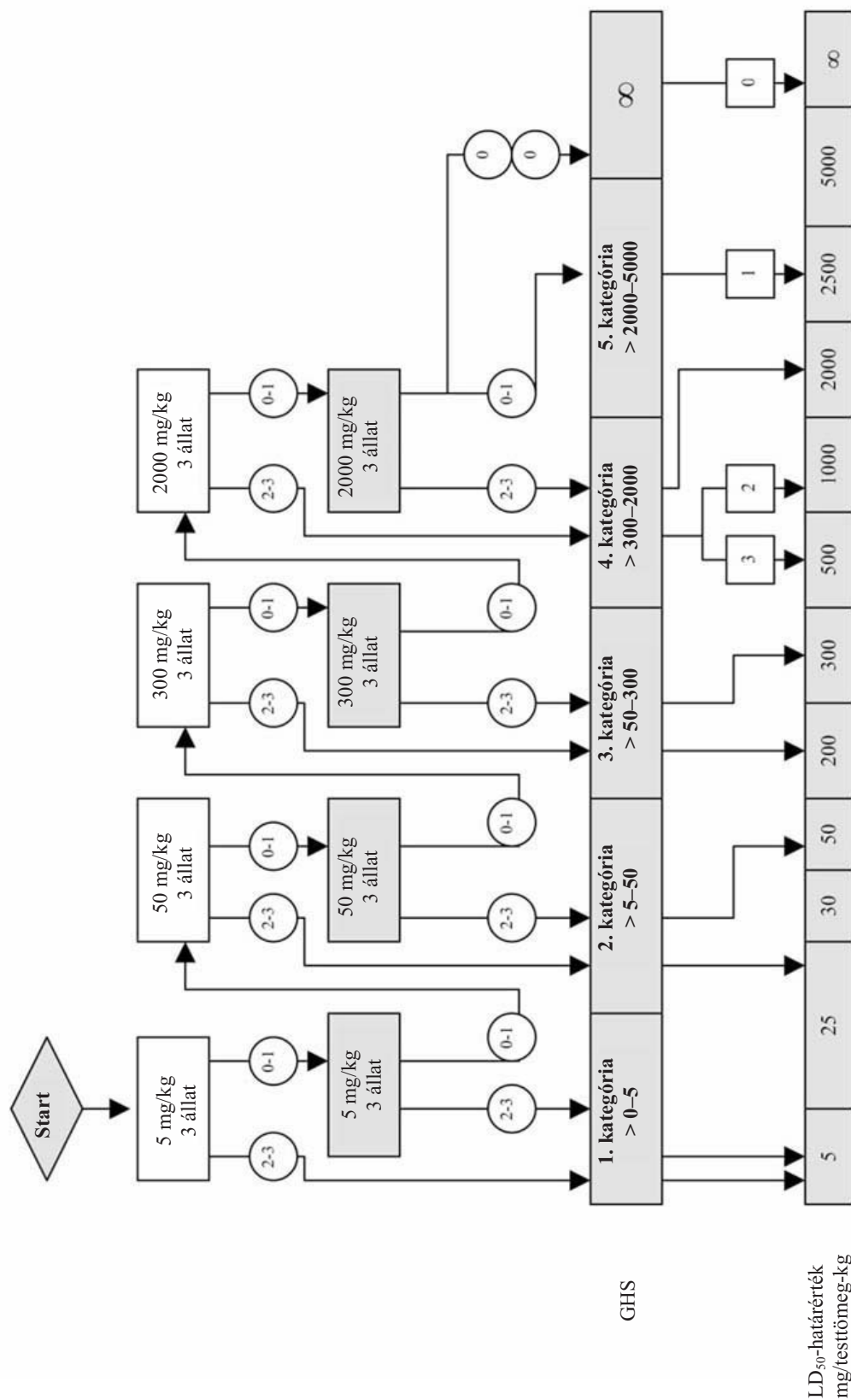
Általános megjegyzések

Minden egyes kezdődózis esetén az ebben a mellékletben bemutatott megfelelő vizsgálati sémák határozzák meg a követendő eljárást.

- 1A. melléklet: a kezdődózis 5 mg/testtömeg-kg
- 1B. melléklet: a kezdődózis 50 mg/testtömeg-kg
- 1C. melléklet: a kezdődózis 300 mg/testtömeg-kg
- 1D. melléklet: a kezdődózis 2000 mg/testtömeg-kg

A humánus módon exterminált vagy elhullott állatok számától függően a vizsgálati eljárás a jelzett nyilakat követi.

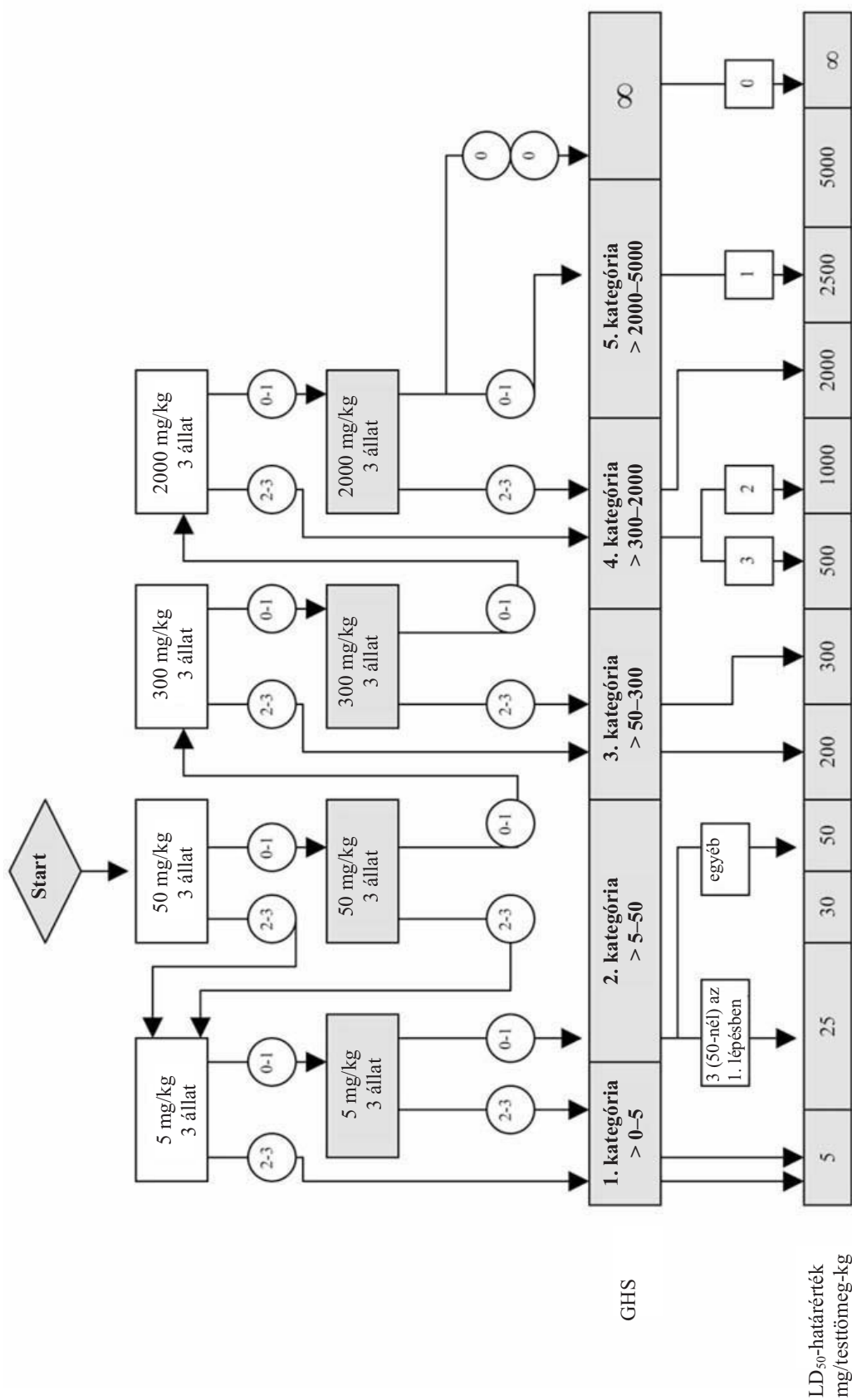
Vizsgálati eljárás 5 mg/testtömeg-kg kezdődózis esetén



– lépésenként 3 azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak
 – 0, 1, 2, 3: az elhullásközeli állapotban lévő vagy elhullott állatok száma az egyes lépésekben
 – GHS: Globálisan harmonizált besorolási rendszer (mg / testtömeg-kg)

– ∞: be nem sorolt
 – – vizsgálat 5000 mg / testtömeg-kg-nál: 1.: 2. melléklet

Vizsgálati eljárás 50 mg/testtömeg-kg kezdődózis esetén

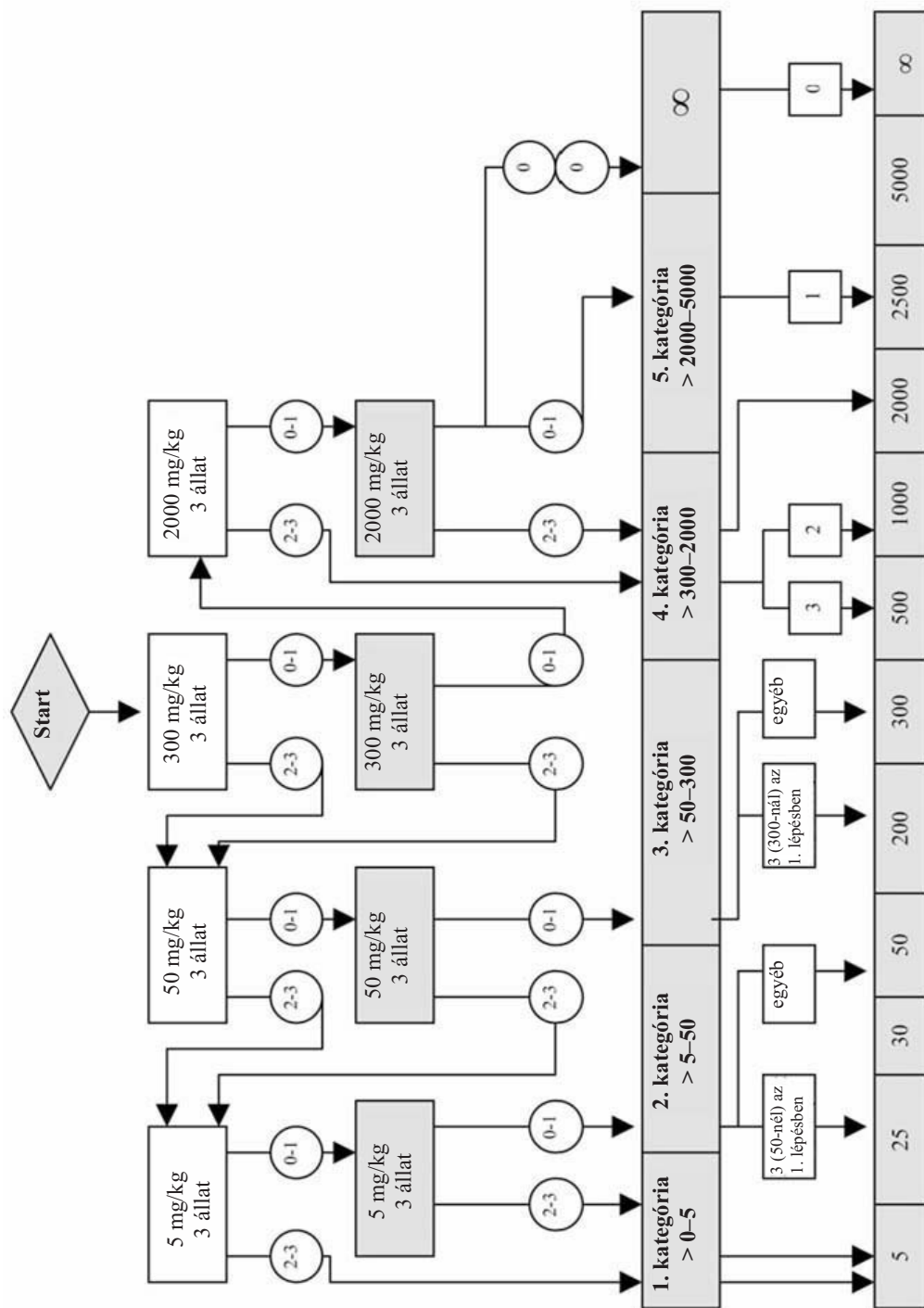


lépésként 3 azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak
0, 1, 2, 3: az elhullásközeli állapotban lévő vagy elhullott állatok száma az egyes lépésekben
GHS: Globálisan harmonizált besorolási rendszer (mg / testtömeg-kg)

∞: be nem sorolt vizsgálat 5000 mg / testtömeg-k-nál: 1.: 2. melléklet

IC. melléklet

Vizsgálati eljárás 300 mg/testtömeg-kg kezdődózis esetén



GHS

LD₅₀-határérték
mg/testtömeg-kg

lépésként 3 azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak
0, 1, 2, 3: az ellútlasközeli állapotban lévő vagy ellútlott állatok száma az egyes lépésekben
GHS: Globálisan harmonizált besorolási rendszer (mg / testtömeg-kg)

— ∞ : be nem sorolt
— vizsgálat 5000 mg / testtömeg-k-g-nál: 1.: 2. melléklet

2. melléklet

A várhatóan 2000 mg/kg feletti LD₅₀-értékkel rendelkező vizsgálandó anyagok vizsgálatok nélküli osztályozásának kritériumai

Az 5. veszélyességi kategória kritériumait úgy állapították meg, hogy tegyék lehetővé azoknak a vizsgálandó anyagoknak a meghatározását, amelyek akut toxicitási kockázata viszonylag alacsony, de bizonyos körülmények között veszélyt jelenthetnek az érzékeny populációkra. Az ilyen anyagok orális vagy dermális LD₅₀-értéke várhatóan 2000 és 5000 mg/kg közötti tartományban található, vagy ezzel egyenértékű dózisoknak megfelelő az egyéb beadási módok esetében. A vizsgálandó anyagokat az alábbi esetekben kell a 2000 mg/kg < LD₅₀ < 5000 mg/kg veszélyességi kategóriába (GHS 5. kategória) sorolni:

a) ha az 1A–1D. mellékletben bemutatott, az elhullási gyakoriságon alapuló vizsgálati sémák bármelyike szerint ebbe a kategóriába kell sorolni,

b) ha hitelt érdemlő bizonyíték van már arra, hogy az anyag LD₅₀-értéke az 5. kategóriában megadott tartományba esik; vagy más állatkísérletek vagy humán toxikus hatások szerint a humán egészségügyi veszély akut jellegű,

c) adatok extrapolálásával, becslésével vagy mérésével, ha egy veszélyesebb osztályba való besorolás nem indokolt, és

- hitelt érdemlő információk emberben jelentős toxikus hatásokra utalnak, vagy
- a legfeljebb 4. kategóriának megfelelő értékekkel elvégzett orális beadási móddal történő vizsgálatok során elhullás történt, vagy
- ha a legfeljebb 4. kategóriának megfelelő értékekkel elvégzett vizsgálat alapján a szakértők véleménye megerősíti a toxicitás szignifikáns klinikai tüneteit, kivéve a hasmenést, szörmeredezést vagy gondozatlan megjelenést, vagy
- ha a szakértők véleménye megerősíti azokat a hitelt érdemlő információkat, amelyek más állatkísérletekben tapasztalt szignifikáns akut hatásokat valószínűsítene.

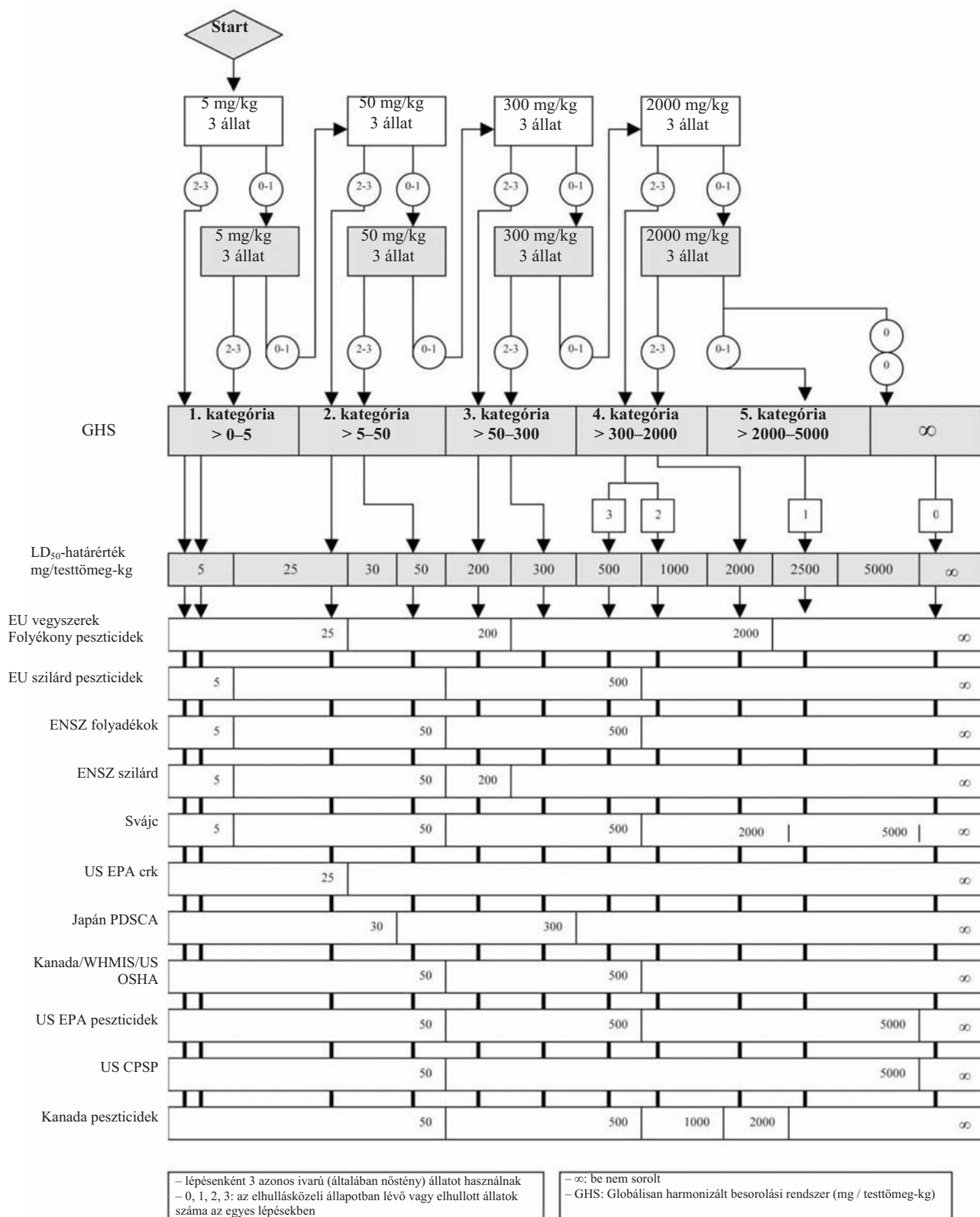
2000 mg/kg feletti dózissal történő vizsgálat

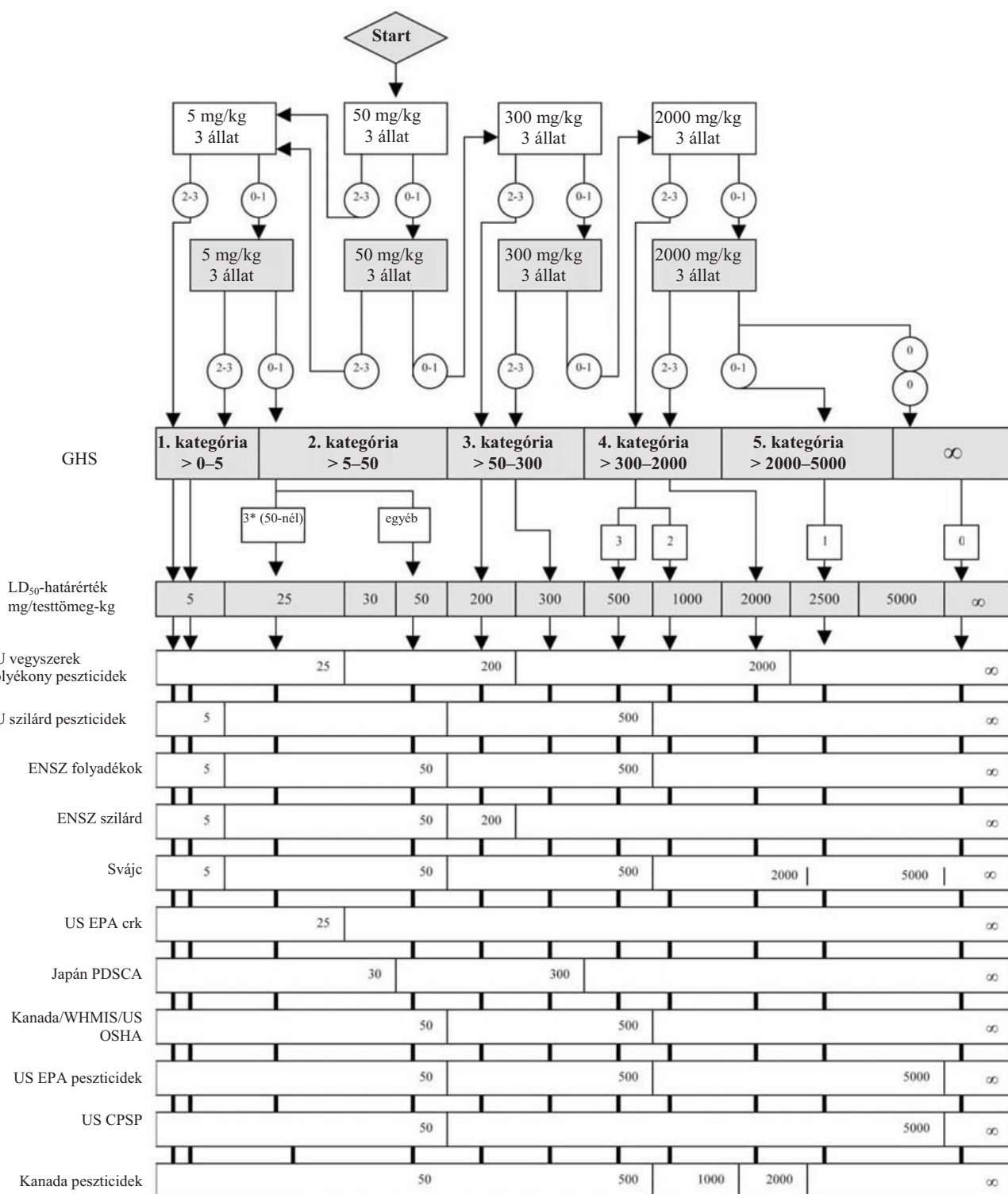
Az állatok jólétének védelme iránti igényt elismerve nem ajánlott, hogy állatokat az 5. kategória tartományában (5000 mg/kg) vizsgálják, és csak akkor szabad fontolóra venni, ha nagy a valószínűsége, hogy az ilyen vizsgálatok eredményei közvetlen jelentőséggel bírnak az állati vagy emberi egészség védelme szempontjából (10). Nem szabad további vizsgálatokat végezni ennél magasabb dózissal.

Ha vizsgálatot kell végezni, csak egy lépés (azaz három állat), az 5000 mg/kg-os dózis alkalmazása szükséges. Ha az első kezelt állat elhullik, akkor az 1. mellékletben bemutatott folyamatábrának megfelelően a kezelést a 2000 mg/kg-os dózissal kell folytatni. Ha az első állat életben marad, két további állatot kell kezelni. Ha a három állat közül csak egy hüllik el, az LD₅₀-érték várhatóan meghaladja az 5000 mg/kg-ot. Ha mindkét állat elhullik, akkor a vizsgálatot a 2000 mg/kg-os dózissal kell folytatni.

3. melléklet

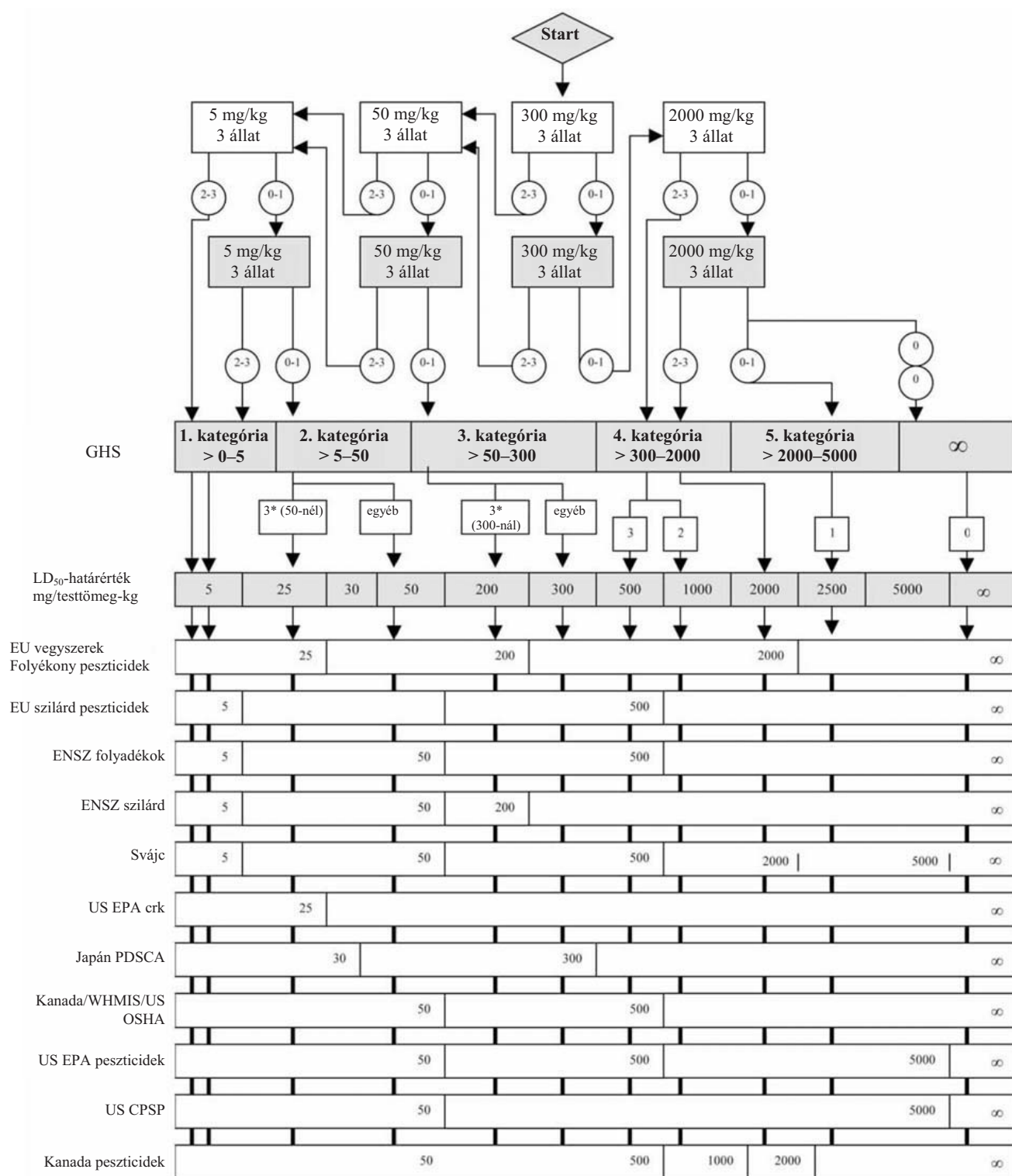
**B.1c. Vizsgálati módszer: Útmutató az EU-rendszer szerinti besoroláshoz
a Globálisan harmonizált osztályozási rendszer (GHS) teljes körű bevezetéséig tartó átmeneti időszakban
[a (8) hivatkozásból]**





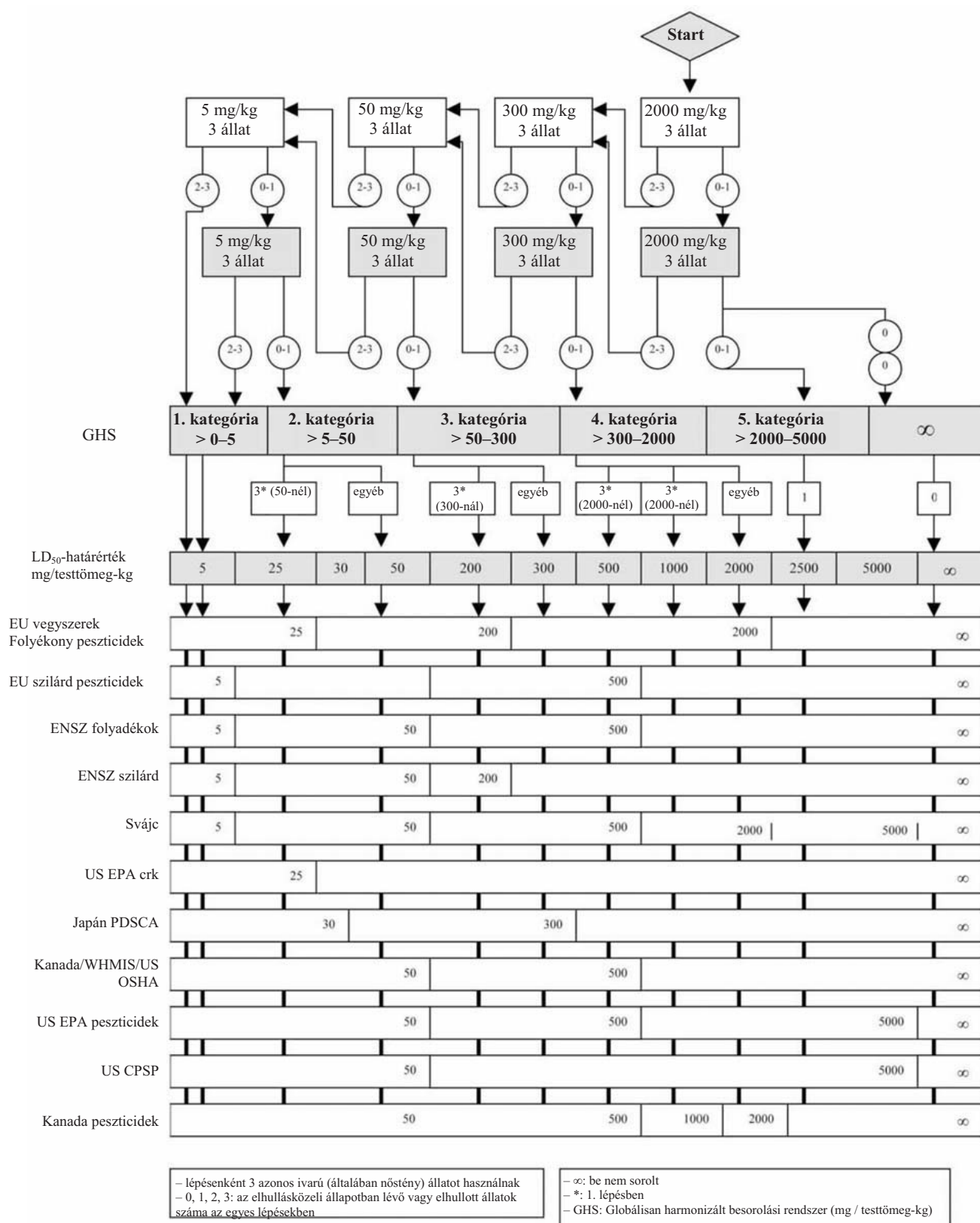
– lépésenként 3 azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak
 – 0, 1, 2, 3: az elhullásközeli állapotban lévő vagy elhullott állatok
 száma az egyes lépésekben

– ∞: be nem sorolt
 – *: 1. lépésben
 – GHS: Globálisan harmonizált besorolási rendszer (mg / testtömeg-kg)



– lépésenként 3 azonos ivarú (általában nőstény) állatot használnak
 – 0, 1, 2, 3: az elhullásközeli állapotban lévő vagy elhullott állatok
 száma az egyes lépésekben

– ∞ : be nem sorolt
 – *: 1. lépésben
 – GHS: Globálisan harmonizált besorolási rendszer (mg / testtömeg-kg)



3. számú melléklet az 56/2005. (XI. 29.) EüM–KvVM–BM együttes rendelethez**B.1a. AKUT ORÁLIS TOXICITÁS – RÖGZÍTETT DÓZISÚ ELJÁRÁS****1. MÓDSZER**

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 420 (2001) módszerrel.

1.1. Bevezetés

Az akut toxicitás megállapítására szolgáló hagyományos módszerek esetében a vizsgálat végpontját az állatok elpusztulása jelenti. A Brit Toxikológiai Társaság 1984-ben új megközelítést javasolt az akut toxicitás vizsgálatára, amely egy sor rögzített nagyságú dózis beadásán alapul (1). Ennél a megközelítésnél nem az állatok elpusztulása jelenti a vizsgálat végpontját, hanem a rögzített nagyságú dózisok valamelyikénél megfigyelt egyértelmű mérgezési tünetekre támaszkodtak. Az Egyesült Királyságban (2) és nemzetközileg (3) végzett *in vivo* validálási vizsgálatok után az eljárást 1992-ben hagyták jóvá mint vizsgálati módszert. Ezt követően egy vizsgálati sorozat (4) (5) (6) keretében matematikai modellek segítségével megvizsgálták a rögzített dózisú eljárás statisztikai tulajdonságait. Az *in vivo* és a modell vizsgálatok együttesen igazolták, hogy az eljárás reprodukálható, kevesebb kísérleti állatra van szükség hozzá, és kevesebb szenvedést okoz, mint a hagyományos módszerek, továbbá hasonló módon képes minősíteni az anyagokat, mint az egyéb akut toxicitási vizsgálati módszerek.

Arról, hogy egy adott célra melyik a legmegfelelőbb vizsgálati módszer, az Akut Orális Toxicitási Vizsgálatok Útmutatójában (7) található iránymutatás. Ez az útmutató további információkat is tartalmaz a B.1a. vizsgálati módszer alkalmazásával és értelmezésével kapcsolatosan.

A módszer egyik alapelve, hogy a fő vizsgálatban csak közepesen toxikus dózisokat alkalmaznak, és hogy kerülni kell az olyan dózisok alkalmazását, amelyek várhatóan letálisak. Nincs szükség továbbá olyan dózisok alkalmazására sem, amelyek korróziós vagy súlyosan irritáló hatásuk miatt kifejezett fájdalmat vagy szorongást okoznak. Az elhullás közelében lévő állatokat vagy azokat, amelyek nyilvánvalóan fájdalmakkal küszködnek, vagy súlyos és tartós szorongás jeleit mutatják, humánus módon exterminálni kell, és ugyanúgy kell figyelembe venni őket a vizsgálati eredmények értelmezésekor, mint azokat az állatokat, amelyek elhullottak a vizsgálatok során. A megjósolható vagy közeli elhullás felismerését segítő iránymutatás, valamint az elhullás közelében lévő vagy súlyosan szenvedő állatok exterminálására vonatkozó döntési kritériumok egy másik útmutatóban (8) találhatók.

A módszer adatokat szolgáltat az anyag veszélyes tulajdonságairól és lehetővé teszi, hogy az anyagot az akut toxicitást okozó anyagok besorolására szolgáló Vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének egyetemes harmonizált rendszere (Globally Harmonised System, GHS) szerint minősítsék és sorolják be (9).

A vizsgáló laboratóriumnak a vizsgálat elvégzése előtt a vizsgálandó anyaggal kapcsolatos minden rendelkezésre álló információt figyelembe kell vennie. Ilyen információk az anyag megjelölése és kémiai szerkezete; fizikai-kémiai tulajdonságai; bármely más, az anyaggal elvégzett *in vitro* vagy *in vivo* toxicitási vizsgálat eredményei; szerkezetileg rokon anyagok toxikológiai adatai és az anyag várható alkalmazása(i). Ezekre az információkra azért van szükség, hogy minden érintett meggyőződjön arról, hogy a vizsgálat releváns az emberi egészség védelme szempontjából, és elősegíti majd a megfelelő kezdődózis kiválasztását.

1.2. Fogalommeghatározások

»Akut orális toxicitás«: a vizsgálandó anyag egyszeri vagy 24 órán belül többszöri dózisának szájon át történő beadását követően jelentkező káros hatások.

»Késleltetett elhullás«: egy állat 48 órán belül nem hull el, illetve nem tűnik elhullásközeli állapotban lévőnek, de később, a 14 napos megfigyelési időszak során elpusztul.

»Dózis«: a vizsgálandó anyag beadott mennyisége. A dózist a vizsgálandó anyagnak a kísérleti állatok testtömeg-egységére számított tömegében (pl. mg/kg) fejezik ki.

»Nyilvánvaló toxicitás«: a vizsgálandó anyag beadását követően jól látható mérgezési tüneteket leíró általános kifejezés [a példákat lásd a (3) hivatkozásban], amelynél a következő legmagasabb rögzített dózis esetében a legtöbb állatnál súlyos fájdalom vagy súlyos szorongás tartós jelei, elhullásközeli állapot [az ezzel kapcsolatos kritériumok a Humane Endpoints Guidance Documentben (8) szerepelnek], vagy valószínű elhullás várható.

»GHS«: Vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének egyetemes harmonizált rendszere. Az OECD (emberi egészség és környezet), az ENSZ Veszélyes Anyagok Szállításának Szakértői Bizottsága (fizikai-kémiai tulajdonságok) és az ILO (veszély nyilvánosságra hozatala) közös tevékenysége, amelyet a Szervezetek közötti program a vegyi anyagok helyes kezelésére (Interorganisation Programme of the Sound Management of Chemicals, IOMC) koordinál.

»Közeli elhullás«: amikor a legközelebbi tervezett megfigyelés időpontja előtt elhullásközeli állapot kialakulása vagy elhullás várható. Rágcsálók esetében erre utaló jelek lehetnek a görcsök, az oldalhelyzet, a fekvőhelyzet és a remegés. [A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (8)].

»LD₅₀: (közepes letális dózis)«: a vizsgálandó anyag statisztikailag levezetett egyszeri olyan dózisa, amely oráisan beadva az állatok 50%-ának elhullását okozza. Az LD₅₀-értéket a vizsgálandó anyagnak a kísérleti állatok testtömeg-egységére számított tömegében (mg/kg) fejezik ki.

»Határdózis«: egy, a vizsgálhatóság felső határánál lévő dózis (2000 vagy 5000 mg/kg).

»Elhullásközel állapot«: az esetleges kezelés ellenére is az elhullás közelében lévő állapot vagy túlélésre való képtelenség. [A további részleteket lásd a Humane Endpoints Guidance Documentben (8)].

»Megjósolható elhullás«: a kísérlet tervezett vége előtt, a jövőben egy ismert időpontban való elhullásra utaló klinikai tünetek megléte, például: a víz vagy az élelem elérésére való képtelenség. [A további részleteket lásd Humane Endpoints Guidance Documentben (8).]

1.3. A vizsgálati módszer elve

Azonos ivarba tartozó állatok csoportjainak egy lépcsőzetes eljárás során 5, 50, 300 és 2000 mg/kg-os rögzített dózisok alkalmazásával kell beadni a vizsgálandó anyagot (kivételes esetben egy további, 5000 mg/kg-os rögzített dózis is alkalmazható; lásd az 1.6.2. szakaszt). A kiindulási dózist a dózisbehatároló vizsgálat alapján kell megválasztani úgy, hogy az várhatóan mérgezési tüneteket eredményezzen, de ne okozzon súlyos mérgezést vagy elhullást. A fájdalomhoz, szenvedéshez és közeli elhulláshoz társuló klinikai tüneteket és állapotot részletesen egy külön OECD Útmutató (8) ismerteti. A mérgezési tünetek megjelenésétől vagy az elhullás bekövetkeztétől vagy ezek elmaradásától függően további állatcsoportok is kezelhetők magasabb vagy alacsonyabb rögzített dózissal. Az eljárást folytatni kell, amíg meg nem találják azt a dózist, amely nyilvánvaló toxicitást vagy legfeljebb egy elhullást okoz, vagy ha a legmagasabb dózisonál nem figyelnek meg semmilyen hatást, vagy ha a legalacsonyabb dózisonál elhullanak állatok.

1.4. A vizsgálati módszer ismertetése

1.4.1. Az állatfaj kiválasztása

A preferált rágcsálófaj a patkány, bár más rágcsálófajok is alkalmazhatók. Általában nőstényeket használnak (7). Ennek az az oka, hogy a hagyományos LD₅₀-vizsgálatokra vonatkozó szakirodalom áttekintése alapján általában kicsi a különbség a nemek érzékenysége között, de azokban az esetekben, amikor megfigyelhető különbség, a nőstények általában valamivel érzékenyebbek (10). Azonban ha a szerkezetileg rokon vegyületek toxikológiai vagy toxikokinetikai tulajdonságaival kapcsolatos adatok szerint a hímek nagyobb érzékenysége valószínűsíthető, akkor hímeket kell alkalmazni. Megfelelően meg kell indokolni, ha a vizsgálatot hímekkel végzik.

Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell alkalmazni. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek, és nem vemhesek. Az adagolás megkezdésekor az állatoknak 8–12 hetesnek kell lenniük, és testtömegük nem térhet el $\pm 20\%$ -nál többel az esetlegesen korábban kezelt állatok testtömegének átlagától.

1.4.2. Az állatok tartásának és etetésének körülményei

A kísérleti állatokat 22 °C (± 3 °C) hőmérsékletű helyiségben kell tartani. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30%-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70%-ot, a célértékek 50 és 60% között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. Az állatokat lehet vizsgált dózisonként egy ketrecben tartani, de az egy ketrecben lévő állatok számát úgy kell megválasztani, hogy az ne zavarja az egyes állatok megfigyelését.

1.4.3. Az állatok előkészítése

Az állatokat véletlenszerűen kell kiválasztani, majd egyedi azonosítóval kell ellátni, és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben kell tartani őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.4. A dózisok előkészítése

A vizsgálandó anyagokat általában a vizsgálandó dózistartományon belül állandó térfogatban kell beadni úgy, hogy a dóziskészítmény koncentrációját változtatják. Azonban ha folyékony végerterméket vagy keveréket vizsgálnak, a vizsgálatot követő kockázatértékelés szempontjából megfelelőbb lehet, ha a vizsgálandó anyagot hígítatlanul, azaz állandó koncentrációban alkalmazzák, illetve egyes szabályozó hatóságok ezt írják elő. A maximálisan beadható dózistérfogatot azonban egyik esetben sem szabad túllépni. Az, hogy egyszerre maximálisan mekkora térfogatú folyadékot lehet beadni, a kísérleti állat méretétől függ. Rágcsálók esetében a térfogat általában nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömeg-arányt: vizes oldatok esetében azonban 2 ml/100 g testtömeg-arány is megfontolható. A dóziskészítmény formulázásakor – ahol lehet – a vizes oldatok/szuszpenziók/emulziók alkalmazása javasolt, másodsorban az olajos (pl. kukorica-csira-olajban elkészített) oldatok/szuszpenziók/emulziók, és harmadsorban esetlegesen más vivőanyagokban elkészített oldatok. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikológiai tulajdonságait. A dózisokat a beadás előtt rövid idővel kell elkészíteni, kivéve, ha ismert és igazoltan elfogadható a készítmény stabilitása az alkalmazás időtartama alatt.

1.5. Eljárás

1.5.1. A dózisok beadása

A vizsgálandó anyagot egyetlen dózisban, gyomorszondán vagy egy megfelelő intubációs kanülön át történő táplálással kell beadni. Abban a rendkívüli esetben, ha nem lehetséges egyetlen dózist alkalmazni, a dózis egy 24 órát nem meghaladó időtartam alatt kisebb részletekben is beadható.

A kezelés előtt az állatokat éheztetni kell (pl. patkány esetében egy éjszakán át meg kell vonni a táplálékot, de a vizet nem; egér esetében 3–4 órára kell megvonni a táplálékot, de a vizet nem). A koplaltatási időszakot követően meg kell mérni az állatok testtömegét, majd be kell adni a vizsgálandó anyagot. Az anyag beadása után a táplálékot újra meg lehet vonni – patkány esetében 3–4 órára, egér esetében 1–2 órára. Ha egy dózist részletekben adnak be, a beadás időtartamától függően menet közben szükség lehet arra, hogy az állatoknak táplálékot és vizet adjanak.

1.5.2. Dózisbehátároló vizsgálat

A dózisbehátároló vizsgálat célja, hogy ki lehessen választani a megfelelő kezdődózist a fő vizsgálatához. A vizsgálandó anyagot az 1. mellékletben bemutatott folyamatára szerint egymás után kell beadni egy-egy állatnak. A dózisbehátároló vizsgálat akkor fejeződik be, amikor megkapható a döntés a fő vizsgálatban alkalmazandó kezdődózisról (vagy ha a legalacsonyabb rögzített dózisonál elhullás történik).

A dózisbehátároló vizsgálatban a kezdődózist a következő rögzített dózisok közül választják ki: 5, 50, 300 és 2000 mg/kg aszerint, hogy a lehetőleg ugyanezzel az anyaggal vagy szerkezetileg rokon anyagokkal kapott *in vivo* vagy *in vitro* adatok alapján várhatóan melyik eredményez nyilvánvaló toxicitást. Ilyen információk hiányában a kezdődózist 300 mg/kg-ban kell megállapítani.

Az egyes állatok kezelése között legalább 24 órának el kell telnie. Minden állatot legalább 14 napig megfigyelés alatt kell tartani.

Kivételes esetben és kizárólag akkor, ha konkrét jogszabályi követelmény indokolja, megfontolás tárgyává lehet tenni egy további, 5000 mg/kg-os felső rögzített dózis alkalmazását (lásd a 3. mellékletet). Az állatok kímélete érdekében a GHS 5. kategóriában (2000–5000 mg/kg tartomány) nem ajánlott állatokkal kísérletezni, és csak abban az esetben szabad illet tervezni, ha nagy a valószínűsége, hogy egy ilyen vizsgálat eredményei közvetlen jelentőséggel bírnak az emberi vagy állati egészség, illetve a környezet védelme szempontjából.

Olyan esetekben, amikor a dózisbehátároló vizsgálatban a legalacsonyabb rögzített dózissal (5 mg/kg) kezelt állat elhullik, az általános eljárás szerint be kell fejezni a vizsgálatot és az anyagot a GHS 1. kategóriába kell besorolni (ahogyan az az 1. mellékletben látható). Ha azonban szükség van a besorolás további megerősítésére, az alábbiak szerinti opcionális kiegészítő eljárás alkalmazható. Egy második állatnak is beadjuk az 5 mg/kg-os dózist. Ha ez is elhullik, akkor az megerősíti a GHS 1. kategóriába való besorolást, és a vizsgálatot azonnal be kell fejezni. Ha a második állat életben marad, akkor legfeljebb három további állaton kell elvégezni az 5 mg/kg-os dózissal történő vizsgálatot. Mivel nagy az elhullás kockázata, az állatok kímélete érdekében egymás után kell őket kezelni. Az egyes állatok kezelése között eltelt időt úgy kell megválasztani, hogy elegendő legyen annak megállapítására, hogy az előzőleg kezelt állat valószínűleg életben marad. Ha egy második állat is elhullik, azonnal be kell fejezni a kezeléseket, és több állatnak már nem szabad beadni az anyagot. Mivel a második elhullás bekövetkezte miatt (függetlenül attól, hogy a vizsgálatok befejezéséig hány állatot kezeltek) az »A« eredményhez jutnak (legalább 2 elhullás eset), a 2. melléklet 5 mg/kg-os rögzített dózisánál érvényes besorolási szabályt kell követni (ha legalább 2 elhullás történt, akkor 1. kategória, ha legfeljebb 1 elhullás történt, akkor 2. kategória). A 4. mellékletben pedig azzal kapcsolatos útmutatást tartalmaz, hogy az új Vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének egyetemes harmonizált rendszere (GHS) bevezetéséig az anyagokat hogyan kell az EU-rendszer szerinti kategóriákba besorolni.

1.5.3. Fő vizsgálat

1.5.3.1. Az állatok száma és a dózisok

A kezdődózissal történő vizsgálat utáni teendőket a 2. mellékletben található folyamatára mutatja. Három lehetséges alternatíva létezik: vagy le kell állítani a vizsgálatot, és be kell sorolni az anyagot a megfelelő veszélyességi kategóriába, vagy magasabb rögzített dózissal kell folytatni a vizsgálatot, vagy alacsonyabb rögzített dózissal. Az állatok védelme érdekében azonban a fő vizsgálatban már nem szabad olyan dózissal kísérletezni, amely a dózisbehátároló vizsgálatban elhullást okozott (lásd a 2. mellékletet). A tapasztalatok azt mutatják, hogy a kezdődózissal végzett vizsgálatok legvalószínűbb eredménye, hogy az anyagot be lehet valamilyen kategóriába sorolni és nincs szükség további vizsgálatokra.

Általában összesen öt-öt, azonos ivarú állatnak kell beadni az egyes vizsgált dózisokat. Ebből az öt állatból egyet a dózisbehátároló vizsgálat során kezelnek az adott dózissal, és ehhez járul a további négy állat (kivéve abban a szokatlan esetben, ha a fő vizsgálatban használt dózist nem alkalmazták a dózisbehátároló vizsgálatban).

Az egyes dózisok vizsgálata közötti időtartamot a mérgezési tünetek megjelenésének időpontja, időtartama és súlyossága határozza meg. Az állatok következő dózissal történő kezelését nem szabad megkezdeni mindaddig, amíg meg nem bizonyosodtak arról, hogy az előzőleg kezelt állatok életben maradnak. Szükség esetén ajánlott ez egyes dózisokkal való

kezelések között 3 vagy 4 napos szünetet tartani, hogy meg lehessen figyelni a késleltetett toxicitást. Ennek időtartama szükség esetén – pl. nem meggyőző válasz esetében – módosítható.

Ha egy felső, 5000 mg/kg-os dózis alkalmazást is tervbe vesznek, a 3. mellékletben vázolt eljárást kell követni (lásd még az 1.6.2. szakaszt).

1.5.3.2. Határérték-vizsgálat

Határérték-vizsgálatot elsősorban olyan helyzetekben kell végezni, ha a kísérletet végzőnek olyan információi vannak, amelyek szerint a vizsgálandó anyag valószínűleg nem toxikus, azaz csak a hatósági határérték-dózisok felett toxikus. A vizsgálandó anyag toxicitásával kapcsolatban hasonló vegyületek vagy keverékek vagy termékek vizsgálataiból szerezhető információ, figyelembe véve a toxikológiai szempontból fontos komponenseket, illetve azok százalékos arányát. Olyan esetekben, ha kevés az anyag toxicitásával kapcsolatos információ, vagy egyáltalán nem áll rendelkezésre, vagy ha a vizsgálandó anyag várhatóan toxikus, a fő vizsgálatot kell elvégezni.

Ezen iránymutatás céljára határérték-vizsgálatként a normál eljárás alkalmazásával történő, 2000 mg/kg-os (vagy kivételes esetben 5000 mg/kg-os) kezdődőzissal végzett dózisbehatároló vizsgálat, majd ezt követően további négy állat ugyanezzel a dózissal történő kezelése szolgál.

1.6. Megfigyelések

Az állatokat a dózis beadása után egyedileg kell megfigyelni, legalább az első 30 percben, azután az első 24 órában rendszeres időközönként, amelynek során különös figyelemmel kell őket kísérni az első 4 órában, majd ezt követően naponta, összesen 14 napon át, kivéve, ha az állatot állatjóléti okok miatt ki kell venni a vizsgálatból, és humánus módon exterminálni kell, vagy ha az állat elhullik. A megfigyelés időtartamát azonban nem szabad mereven meghatározni. Ezt a mérgezési reakciók, illetve a gyógyulás kezdete és időtartama alapján kell meghatározni, és ilyen módon szükség esetén meg lehet hosszabbítani. Fontos a mérgezési tünetek megjelenésének, illetve megszűnésének időpontja, különösen, ha a mérgezési tünetek inkább késleltetve jelentkeznek (11). Minden megfigyelést szisztematikusan rögzíteni kell olyan módon, hogy minden állat esetében önálló adatsort vesznek fel.

Ha a mérgezési tünetek tartósak, további megfigyelésekre van szükség. Meg kell figyelni a bőr és a szőrzet, a szemek és a nyálkahártyák, valamint a légzési és a keringési rendszer, az autonóm és a központi idegrendszer, illetve a szomatomotoros aktivitás és a viselkedési mintázatok változásait. Figyelemmel kell lenni remegés, görcsök, nyáladás, hasmenés, letargia, alvás és kóma előfordulására is. A Humane Endpoints Guidance Documentben összefoglalt alapelveket és követelményeket is figyelembe kell venni (8). Humánus módon exterminálni kell az elhullásközeli állapotban lévő állatokat, illetve azokat, amelyek súlyos fájdalom vagy tartós szorongás jeleit mutatják. Ha az állatokat humánus okok miatt exterminálni kell, vagy elhullanak, a lehető legpontosabban fel kell jegyezni az elhullás időpontját is.

1.6.1. Testtömeg

Röviddel a vizsgálandó anyag beadása előtt és legalább egy héttel utána minden állat testtömegét egyenként meg kell mérni. A testtömeg-változást ki kell számítani és fel kell jegyezni. A vizsgálat végén az életben maradt állatokat újra meg kell mérni, majd humánus módon exterminálni kell őket.

1.6.2. Kórbonctani vizsgálat

Minden kísérleti állatot makroszkópos boncolásnak kell alávetni (azokat is, amelyek a vizsgálat során elpusztultak, vagy amelyeket állatjóléti okok miatt ki kellett venni a vizsgálatból). Minden állat esetében az összes makroszkópos kórtani elváltozást fel kell jegyezni. A kezdődőzissal beadása után legalább 24 óráig túlélő állatok esetében tervbe lehet venni a makroszkópos kórtani elváltozást mutató szervek mikroszkópos vizsgálatát is, mivel abból hasznos információk nyerhetők.

2. ADATOK

Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett az összes adatot táblázatos formában is össze kell foglalni úgy, hogy minden vizsgálati csoportra vonatkozóan mutassa a csoportban lévő kísérleti állatok számát, valamint azoknak a számát, amelyeknél mérgezési tünetek láthatók, amelyek a vizsgálat során elhullottak vagy humánus módon exterminálásra kerültek, az egyes állatok elhullásának időpontját, a toxikus hatások leírását, időbeli lefolyását és visszafordíthatóságát, valamint a boncolások eredményeit.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek megfelelő módon a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

- fizikai megjelenés, tisztaság és ha releváns, a fizikai-kémiai tulajdonságok (ezen belül az izomerizáció is);
- azonosító adatok, ezen belül a CAS-szám.

Vivőanyag (szükség esetén):

- ha a vivőanyag nem víz, akkor ennek indoklása.

Kísérleti állatok:

- az alkalmazott faj/törzs;
- az állatok mikrobiológiai státusza, feltéve, hogy ismert;
- az állatok száma, életkora és ivara (ezen belül adott esetben annak oka, hogy nőtények helyett miért hímeket alkalmaztak);
- az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.;

Kísérleti körülmények:

- a vizsgálandó anyag formulázására vonatkozó információk, ezen belül a beadott anyag fizikai formájával kapcsolatos adatok;
- a vizsgálandó anyag beadására vonatkozó információk, ezen belül a beadott térfogat és a beadás időpontja;
- a táplálék és a víz minősége (ezen belül a takarmány típusa/forrása, a víz forrása);
- a kezdődózis kiválasztásának indoklása.

Eredmények:

- a válaszadatok és a dózisok táblázatos formában történő megadása minden egyes állatra vonatkozóan (azaz a mérgezési tüneteket mutató és elhullt állatokra; a hatások jellege, súlyossága és időtartama);
- a testtömeg-adatok és a testtömeg-változások táblázatos formában történő megadása;
- az egyes állatok testtömege a dózis beadásának napján, azt követően hetente, valamint az elhullás vagy exterminálás időpontjában;
- a tervezett exterminálás előtti elhullás napja és ideje;
- a mérgezési tünetek megjelenése és időbeli lefolyása, valamint esetleges visszafordíthatósága minden egyes állatra vonatkozóan;
- a boncolások és adott esetben a kórszövettani vizsgálatok eredményei minden egyes állatra vonatkozóan.

Az eredmények diszkussziója és értelmezése.

Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

(1) British Toxicology Society Working Party on Toxicity (1984). Special report: a new approach to the classification of substances and preparations on the basis of their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 3, 85–92.

(2) Van den Heuvel, M.J., Dayan, A.D. and Shillaker, R.O. (1987). Evaluation of the BTS approach to the testing of substances and preparations for their acute toxicity. *Human Toxicol.*, 6, 279–291.

(3) Van den Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Oliver, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J. and Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD₅₀ test. *Fd. Chem. Toxicol.* 28, 469–482.

(4) Whitehead, A. and Curnow, R.N. (1992). Statistical evaluation of the fixed-dose procedure. *Fd. Chem. Toxicol.*, 30, 313–324.

(5) Stallard, N. and Whitehead, A. (1995). Reducing numbers in the fixed-dose procedure. *Human Exptl. Toxicol.* 14, 315–323. *Human Exptl. Toxicol.*

(6) Stallard, N., Whitehead, A. and Ridgeway, P. (2002). Statistical evaluation of the revised fixed dose procedure. *Hum. Exp. Toxicol.*, 21, 183–196.

(7) OECD (2001). Guidance Document on Acute Oral Toxicity Testing. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 24. Paris.

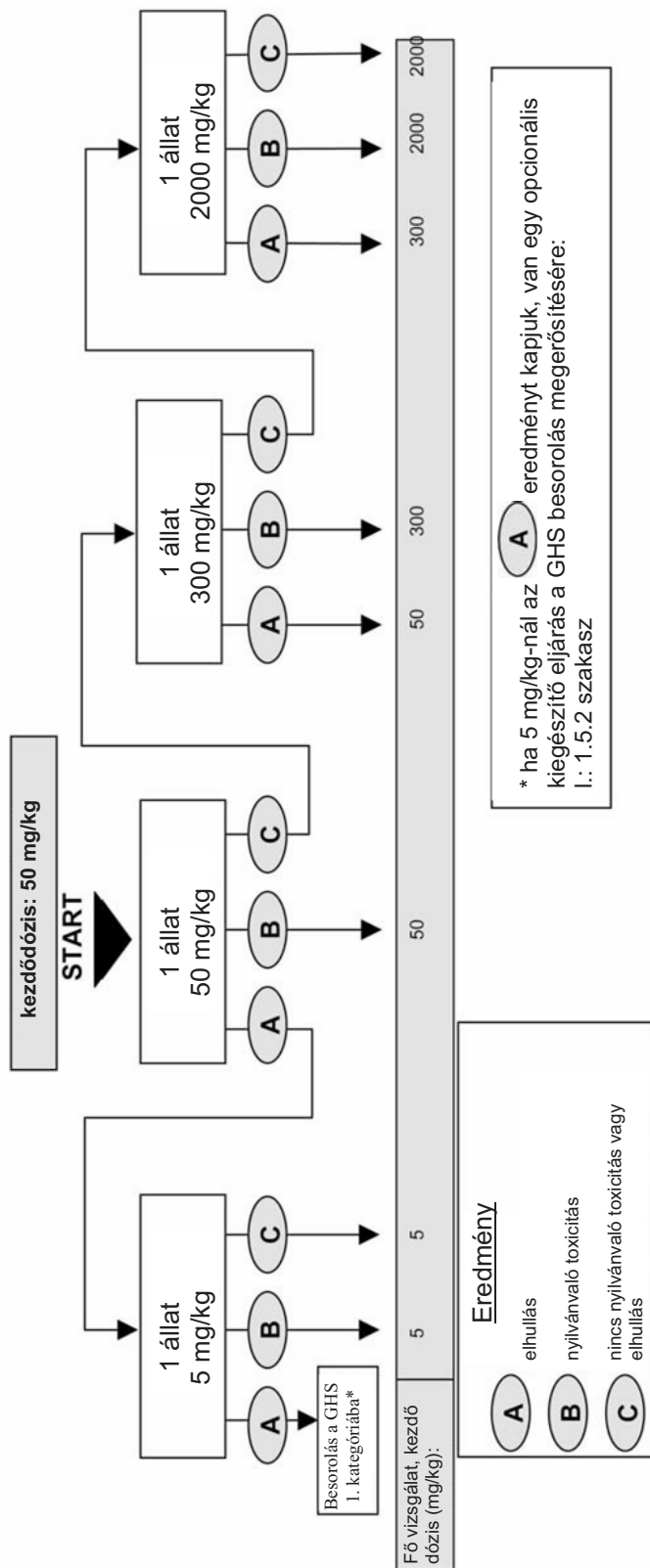
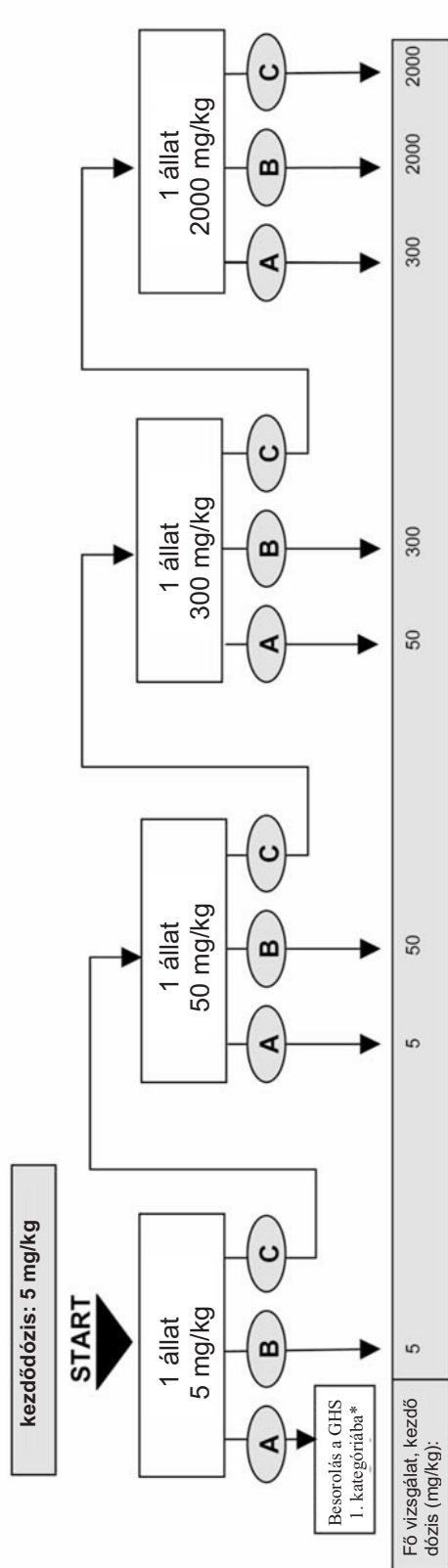
(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment N. 19.

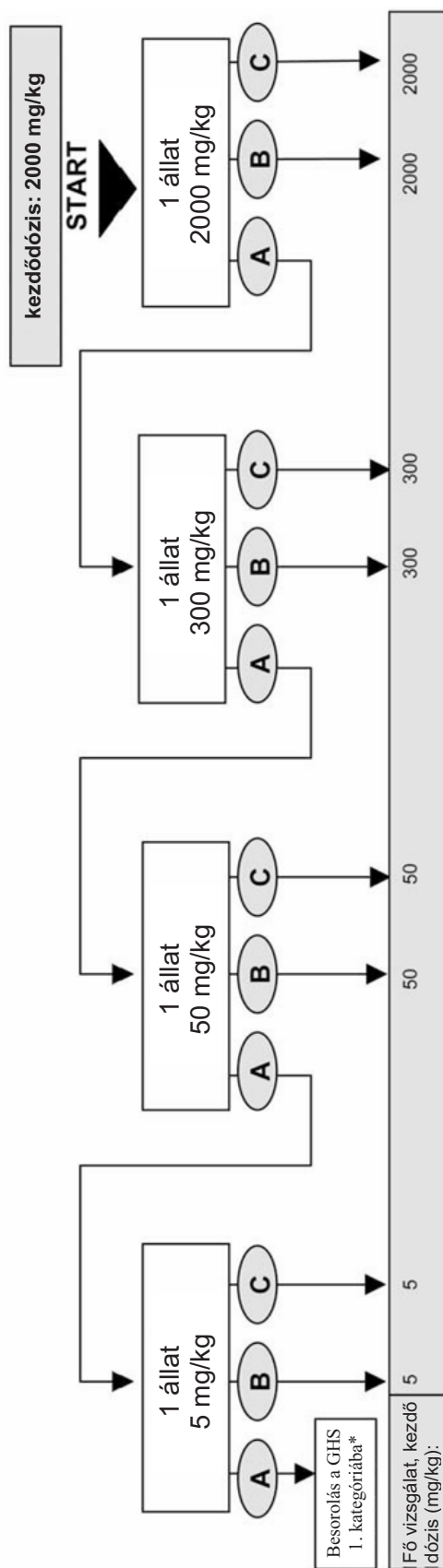
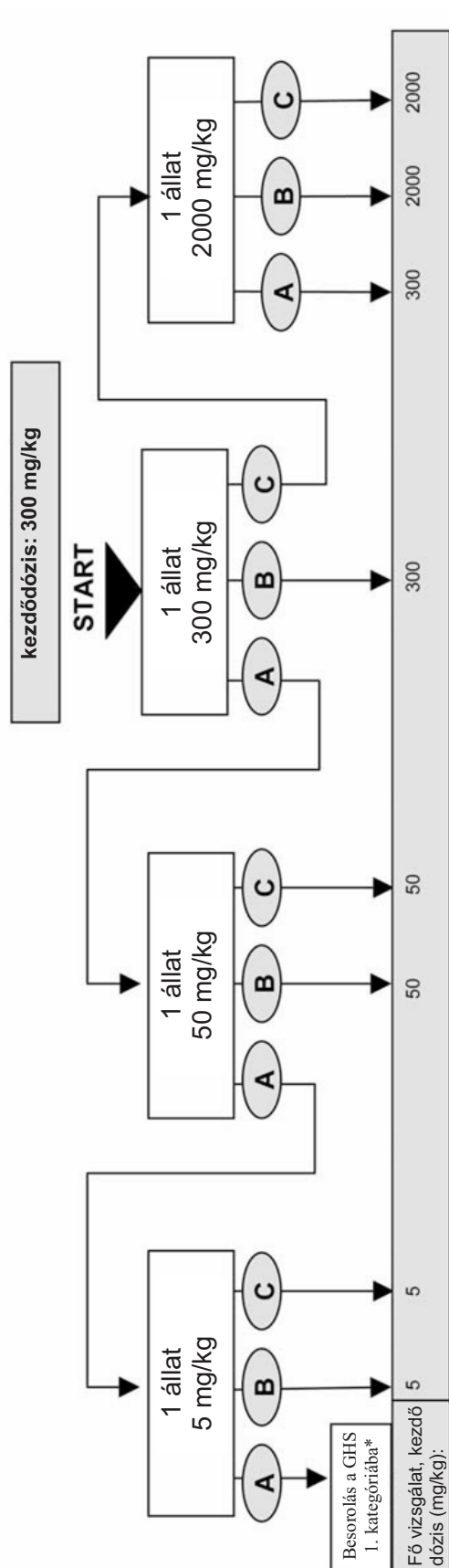
(9) OECD (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11 [<http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>].

(10) Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. (1995). Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD₅₀, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223–231.

(11) Chan P.K and A.W. Hayes (1994) Chapter 16 Acute Toxicity and Eye Irritation. In: Principles and Methods of Toxicology. 3rd Edition. A.W. Hayes, Editor. Raven Press, Ltd. New York, USA.

A dózisbehatároló vizsgálat folyamatábrája





Eredmény

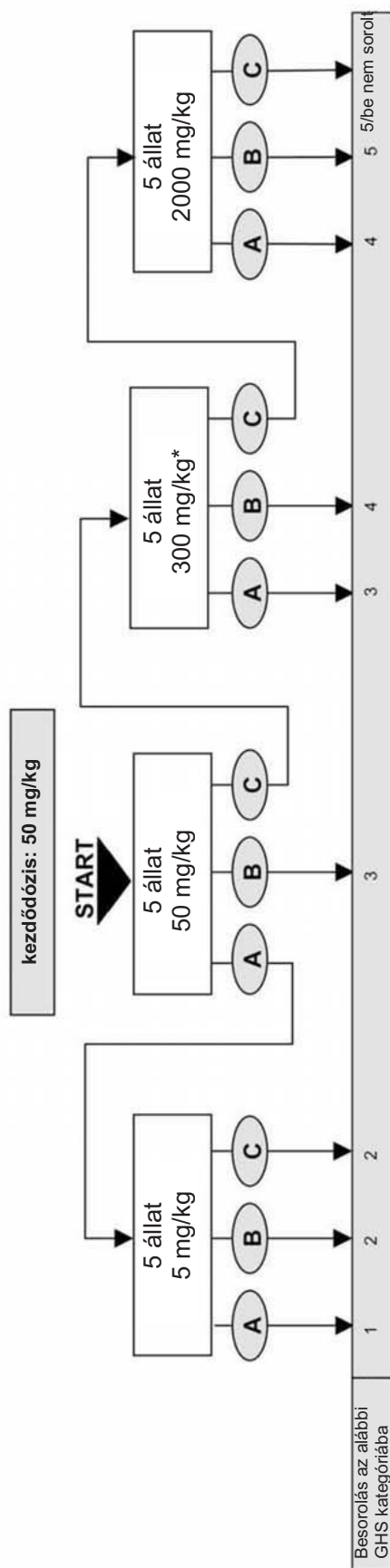
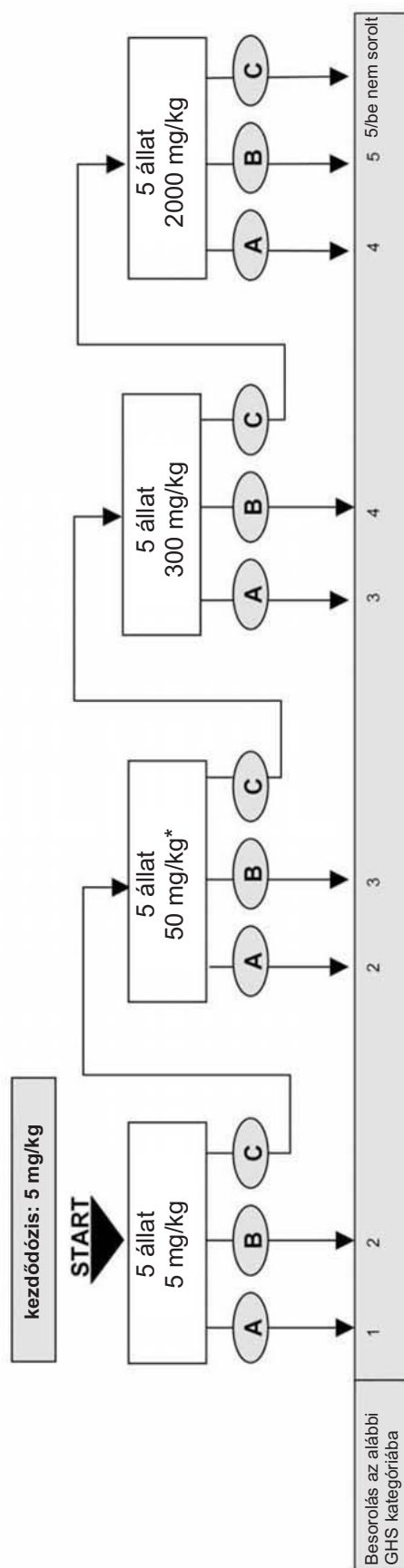
A elhullás

B nyilvánvaló toxicitás

C nincs nyilvánvaló toxicitás vagy elhullás

* ha 5 mg/kg-nál az **A** eredményt kapjuk, van egy opcionális kiegészítő eljárás a GHS besorolás megerősítésére: I.: 1.5.2 szakasz

A fő vizsgálat folyamatábrája

Eredmény

A ≥ 2 elhullás

B ≥ 1 nyilvánvaló toxicitás és/vagy 1 elhullás

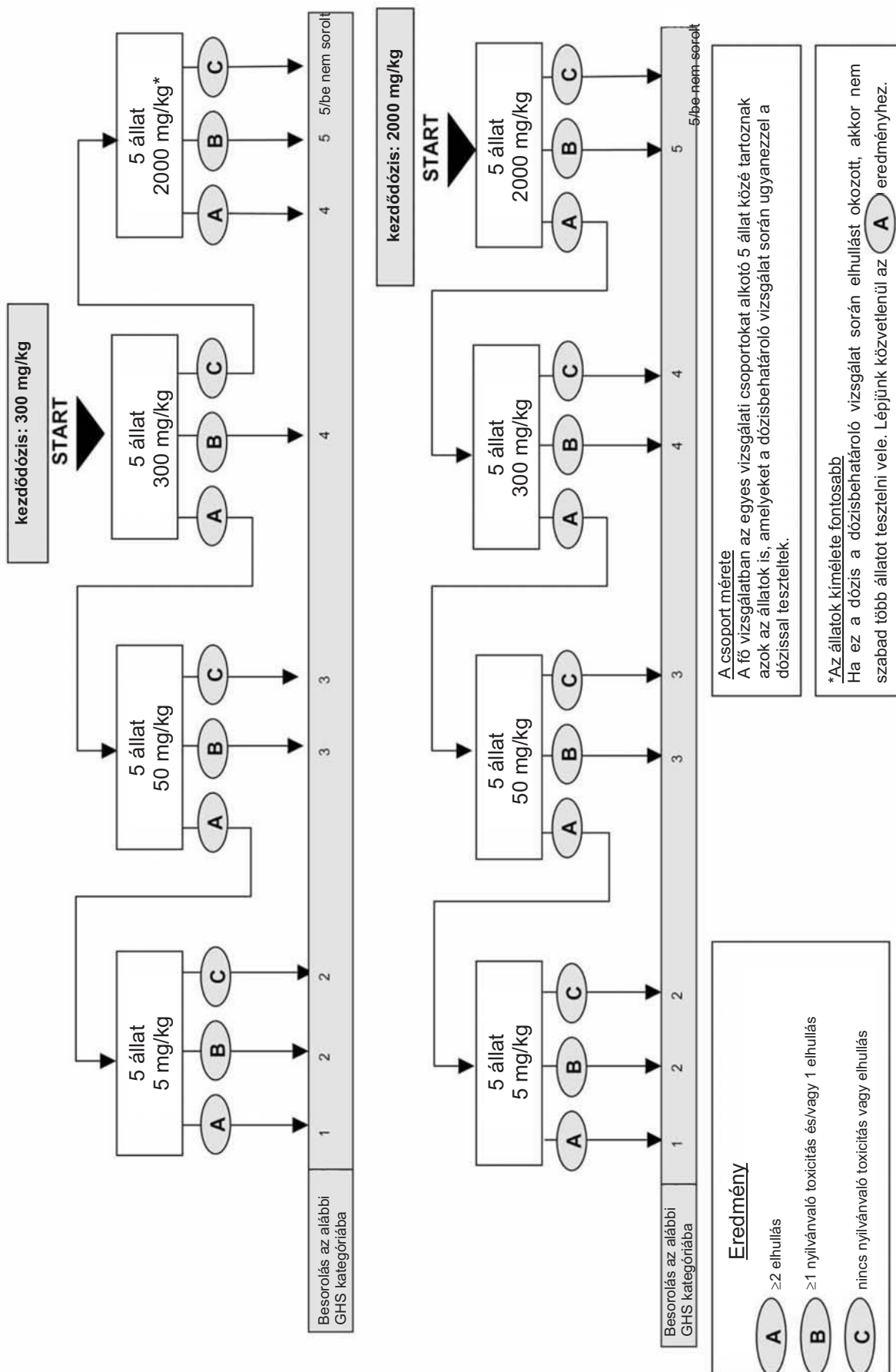
C nincs nyilvánvaló toxicitás vagy elhullás

A csoport mérete

A fő vizsgálatban az egyes vizsgálati csoportokat alkotó 5 állat közé tartoznak azok az állatok is, amelyeket a dózisbehatároló vizsgálat során ugyanezzel a dózissal teszteltek.

*Az állatok kímélete fontosabb

Ha ez a dózis a dózisbehatároló vizsgálat során elhullást okozott, akkor nem szabad több állatot tesztelni vele. Lépünk közvetlenül az **A** eredményhez.



3. melléklet

A várhatóan 2000 mg/kg feletti LD₅₀-értékkel rendelkező vizsgálandó anyagok vizsgálatok nélküli osztályozásának kritériumai

Az 5. veszélyességi kategória kritériumait úgy állapították meg, hogy lehetővé tegyék azoknak a vizsgálandó anyagoknak a meghatározását, amelyek akut toxicitási kockázata viszonylag alacsony, de bizonyos körülmények között veszélyt jelenthetnek az érzékeny populációkra. Az ilyen anyagok orális vagy dermális LD₅₀-értéke várhatóan 2000 és 5000 mg/kg közötti tartományban van, vagy ezzel egyenértékű dózisoknak megfelelő az egyéb beadási módok esetében. A vizsgálandó anyagokat az alábbi esetekben lehet a 2000 mg/kg < LD₅₀ < 5000 mg/kg veszélyességi kategóriába (GHS 5. kategória) sorolni:

a) ha a 2. mellékletben bemutatott, az elhullási gyakoriságon alapuló vizsgálati sémák bármelyike szerint ebbe a kategóriába kell sorolni

b) ha hitelt érdemlő bizonyíték van már arra, hogy az anyag LD₅₀-értéke az 5. kategóriában megadott tartományba esik; vagy más állatkísérletek vagy humán toxikus hatások akut jellegű humán egészségügyi veszélyt jeleznek

c) adatok extrapolálásával, becslésével vagy mérésével, ha egy veszélyesebb osztályba való besorolás nem indokolt, és

- hitelt érdemlő információk állnak rendelkezésre, amelyek emberben jelentős toxikus hatásokra utalnak, vagy
- a legfeljebb a 4. kategóriának megfelelő értékekkel elvégzett, orális beadási móddal történő vizsgálatok során elhullás történt, vagy
- ha legfeljebb a 4. kategóriának megfelelő értékekkel elvégzett vizsgálat alapján a szakértők véleménye megerősíti a toxicitás szignifikáns klinikai tüneteit, kivéve a hasmenést, szörmeredezést vagy gondozatlan megjelenést, vagy
- ha a szakértők véleménye megerősíti azokat a hitelt érdemlő információkat, amelyek más állatkísérletekben tapasztalt szignifikáns akut hatásokat valószínűsítene.

2000 mg/kg feletti dózisokkal történő vizsgálat

Kivételes esetben és kizárólag akkor, ha ezt konkrét jogszabályi követelmény indokolja, tervbe lehet venni egy további felső, 5000 mg/kg-os rögzített dózis alkalmazást. Az állatok jólétének védelme iránti igényt elismerve nem ajánlott az 5000 mg/kg-os dózis alkalmazása, és csak akkor szabad fontolóra venni, ha nagy a valószínűsége, hogy az ilyen vizsgálatok eredményei közvetlen jelentőséggel bírnak az állati vagy emberi egészség védelme szempontjából (9).

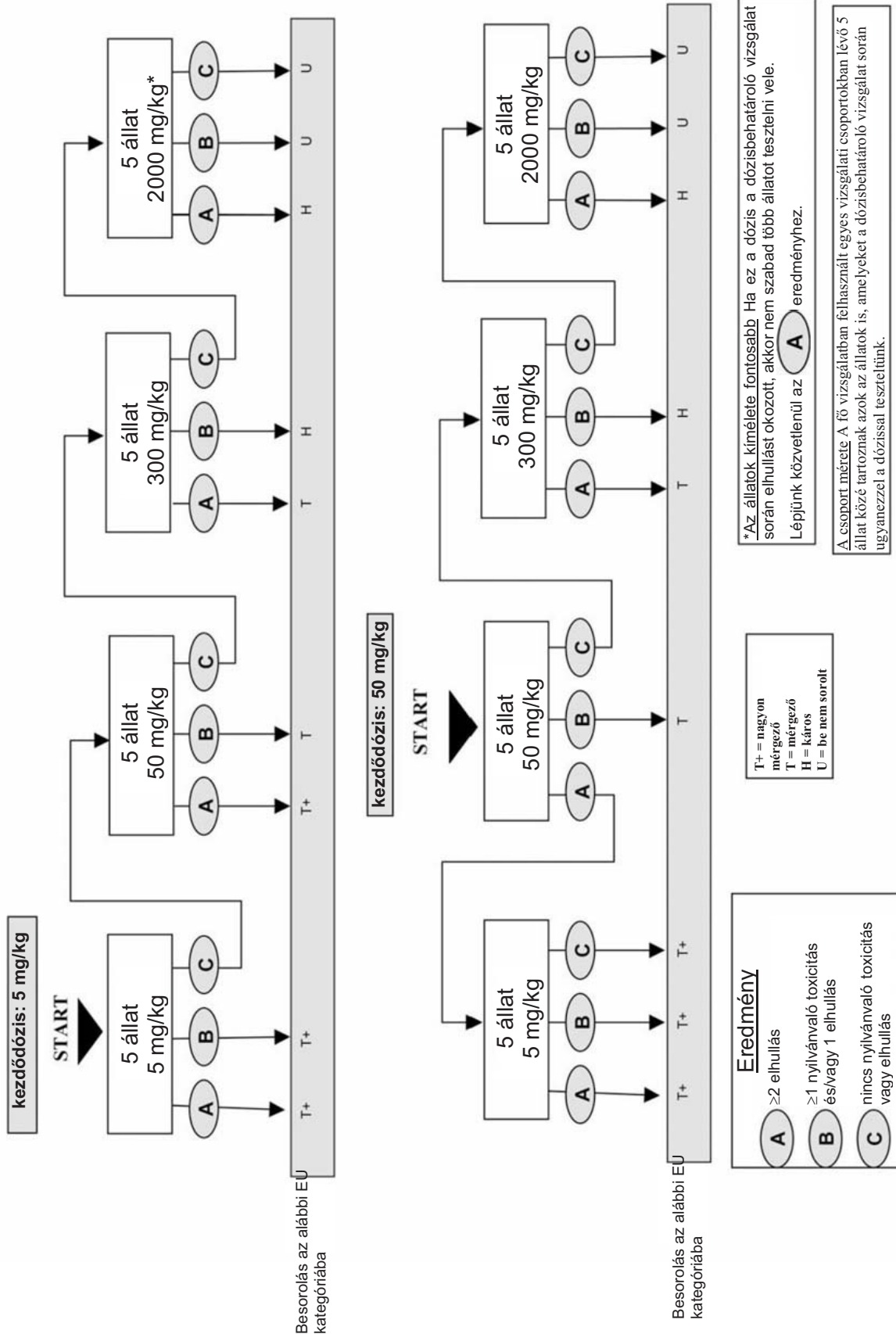
Dózisbehatároló vizsgálat

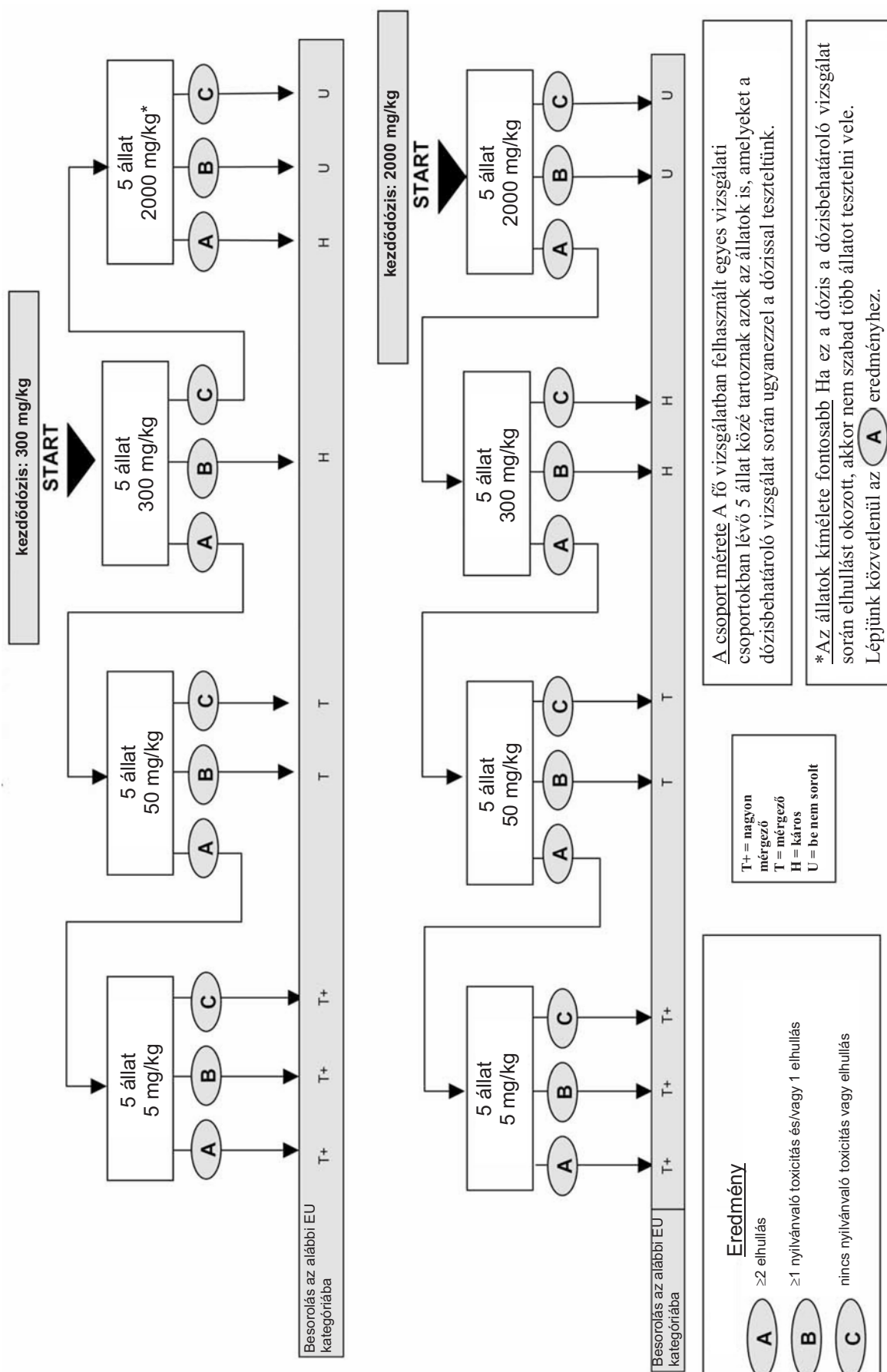
Az 1. mellékletben bemutatott lépcsőzetes eljárás során irányadó döntési szabályokat ki lehet terjeszteni úgy, hogy 5000 mg/kg-os dózisszintet is lehessen alkalmazni. Ha tehát a dózisbehatároló vizsgálatához 5000 mg/kg-os kezdődózt alkalmaznak, az »A« eredmény (elhullás) esetén egy második állatnak 2000 mg/kg-os dózist kell beadni. »B« vagy »C« eredmény esetén (nyilvánvaló toxicitás vagy nincs toxicitás) a fő vizsgálatban 5000 mg/kg-os kezdődózis is alkalmazható. Hasonló módon, ha az 5000 mg/kg-os dózistól eltérő kezdődózt alkalmaznak, a 2000 mg/kg-os dózis alkalmazásakor kapott »B« vagy »C« eredmény esetén a vizsgálatot 5000 mg/kg-os dózissal kell folytatni. Ha ezt követően az »A« eredményhez jutnak, a fő vizsgálatban 2000 mg/kg-os kezdődózt kell alkalmazni, »B« vagy »C« eredmény esetén pedig 5000 mg/kg-os kezdődózt.

Fő vizsgálat

A 2. mellékletben bemutatott lépcsőzetes eljárás során irányadó döntési szabályokat ki lehet terjeszteni úgy, hogy 5000 mg/kg-os dózisszintet is lehessen alkalmazni. Ha tehát a fő vizsgálatához 5000 mg/kg-os kezdődózt alkalmaznak, az »A« eredmény (2 elhullás) esetén egy második csoportnak 2000 mg/kg-os dózist kell beadni. »B« eredmény (nyilvánvaló toxicitás és/vagy 1 elhullás) vagy »C« eredmény (nincs toxicitás) esetén az anyagot a GHS rendszer szerint be nem soroltnak kell tekinteni. Hasonló módon, ha az 5000 mg/kg-os dózistól eltérő kezdődózt alkalmaznak, a 2000 mg/kg-os dózis alkalmazásakor kapott »C« eredmény esetén a vizsgálatot 5000 mg/kg-os dózissal kell folytatni. Ha ezt követően az »A« eredményhez jutnak, az anyagot a GHS 5. kategóriába kell sorolni, »B« vagy »C« eredmény esetén pedig be nem soroltnak kell tekinteni.

B.1a. Vizsgálati módszer – Útmutató az EU-rendszer szerinti besoroláshoz a Globálisan harmonizált osztályozási rendszer (GHS) teljes körű bevezetéséig tartó átmeneti időszakban [a (8) hivatkozásból]





4. számú melléklet az 56/2005. (XI. 29.) EüM–KvVM–BM együttes rendelethez

B.4. AKUT TOXICITÁS: BŐRIRRITÁCIÓ/BŐRKORRÓZIÓS HATÁS

1. MÓDSZER

Ez a módszer egyenértékű az OECD TG 404 (2002) módszerrel.

1.1. Bevezetés

Ennek a továbbfejlesztett módszernek a kidolgozása során külön figyelmet szenteltek az állatjóléti szempontokkal kapcsolatos lehetséges javító beavatkozásoknak és a vizsgálandó anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló összes információ kiértékelésének, hogy ezáltal elkerülhető legyen a laboratóriumi állatokon történő szükségtelen kísérletezés. A módszer ajánlást fogalmaz meg arra nézve, hogy az anyag korróziós vagy irritáló hatásának vizsgálatára előírt *in vivo* kísérlet elvégzése előtt el kell végezni a rendelkezésre álló adatok bizonyító erejének elemzését (weight-of-the-evidence analysis). Ha nem áll rendelkezésre elegendő adat, akkor ezek mennyisége lépcsőzetes vizsgálatok alkalmazásával növelhető (1). A vizsgálati stratégia részét képezi validált és elfogadott *in vitro* vizsgálatok végzése, amelyek a módszerhez csatolt mellékletben kerülnek ismertetésre. Emellett javasolt, hogy – ahol lehet – a kiindulási *in vivo* vizsgálat során az állatra ne egyszerre, hanem időben egymás után helyezték fel a három tesztanyagot.

A tudományos ésszerűség és az állatok kímélete érdekében nem szabad *in vivo* vizsgálatokat végezni mindaddig, amíg az anyag potenciális korróziós/bőrirritáló hatására vonatkozó összes rendelkezésre álló adaton el nem végezték azok bizonyító erejének elemzését. Ilyen adatok az embereken és/vagy laboratóriumi állatokon elvégzett vizsgálatok eredményei, a szerkezetileg rokon anyagok vagy elemeik korróziós/irritáló hatásaival kapcsolatos bizonyítékok, az anyag erős savasságát vagy lúgosságát igazoló adatok (2) (3), valamint a validált és elfogadott *in vitro* vagy *ex vivo* vizsgálatokból kapott eredmények (4) (5) (5a). Az elemzésnek csökkentenie kell az *in vivo* bőrkorróziós/bőrirritációs vizsgálatok iránti igényt azoknak az anyagoknak az esetében, amelyekre az említett két végpont tekintetében más vizsgálatokból elegendő bizonyíték áll rendelkezésre.

A preferált lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amely validált és elfogadott *in vitro* vagy *ex vivo* korróziós/irritációs vizsgálatok elvégzését is magában foglalja, a módszerhez csatolt mellékletben kerül ismertetésre. A stratégiát egy OECD-munkaértekezlet (6) résztvevői dolgozták ki, javasolták egyhangúlag, majd fogadták el mint a Vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének egyetemes harmonizált rendszere (GHS) (7) ajánlott vizsgálati stratégiáját. Az *in vivo* vizsgálatok elvégzése előtt ezt a vizsgálati stratégiát javasolt követni. Új anyagok esetében ez az ajánlott lépcsőzetes vizsgálati megközelítés a tudományos szempontból megfelelő adatok gyűjtésére az anyag korróziós/irritáló hatásaival kapcsolatosan. Ismert anyagok esetében, ha nem áll rendelkezésre elegendő adat a bőrkorróziós/bőrirritáló hatásokról, ennek a stratégiának az alkalmazásával kell pótolni a hiányzó adatokat. Megfelelően meg kell indokolni az ettől eltérő vizsgálati stratégia vagy eljárás alkalmazását, vagy ha úgy döntenek, hogy nem használják a lépcsőzetes vizsgálati megközelítést.

Ha a korróziós vagy irritáló hatásokat nem lehet meghatározni az adatok bizonyító erejének elemzésével, a lépcsőzetes vizsgálati stratégiával összhangban fontolóra kell venni *in vivo* vizsgálatok elvégzését (lásd a mellékletben).

1.2. Fogalommeghatározások

»Bőrirritáció«: a vizsgálandó anyag alkalmazását követően 4 órán belül megjelenő, visszafordítható bőrkárosodás.

»Bőrkorróziós hatás«: a vizsgálandó anyag alkalmazását követően négy órán belül megjelenő, visszafordíthatatlan bőrkárosodás, azaz a felhámot át az irhára is áttérjedő látható szövetelhalás. A korróziós reakciót fekélyek, vérzés, véres var, illetve a 14 napos megfigyelési időszak végén a bőr kifehéredése miatti elszíneződések, teljesen szörtelen területek és hegek jellemzik. A problémás léziók kiértékelése érdekében fontolóra kell venni kórszövettani vizsgálatok elvégzését.

1.3. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálandó anyagot egyetlen dózisban kell alkalmazni a kísérleti állat bőrén; a vizsgált állat nem kezelt bőrfelületei szolgálnak kontrollként. Az irritáció/korrózió mértékét meghatározott időközönként kell ellenőrizni és értékelni, továbbá a hatások teljes kiértékelése érdekében részletesebben is ismertetni. A vizsgálat időtartamának elég hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy meg lehessen határozni a megfigyelt hatások visszafordíthatóságát vagy visszafordíthatatlanságát.

A vizsgálat bármely fázisában tartós súlyos szorongás és/vagy fájdalom jeleit mutató állatokat humánus módon exterminálni kell, és az anyagot ennek megfelelően kell értékelni. Az elhullás közelében lévő és súlyosan szenvedő állatok humánus módon történő exterminálásáról szóló döntéssel kapcsolatos kritériumok a (8) hivatkozásban találhatók.

1.4. A vizsgálati módszer ismertetése

1.4.1. Az *in vivo* vizsgálat előkészítése

1.4.1.1. Az állatfaj kiválasztása

A preferált laboratóriumi állatfaj az albínó nyúl, és egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell alkalmazni. Más fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell.

1.4.1.2. Az állatok előkészítése

A vizsgálat előtt körülbelül 24 órával el kell távolítani az állat szőrzetét úgy, hogy teljesen le kell nyírni az állat törzsének dorzális területét. Vigyázni kell arra, hogy eközben ne dörzsöljék ki az állat bőrét, és csak olyan állatokat szabad alkalmazni, amelyek bőre ép és egészséges.

Egyes nyúltörzsek szőrzete sűrű foltokban nő, amelyek az év egyes szakaszaiban még szembetűnőbbek. Nem szabad vizsgálati területként használni az ilyen sűrű szőrzetnövekedéssel jellemzett részeket.

1.4.1.3. Az állatok tartásának és etetésének körülményei

Az állatokat egyedileg kell elhelyezni. Nyulak esetében a kísérleti helyiség hőmérsékletének 20 °C (± 3 °C)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30%-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70%-ot, a célértéknek 50 és 60% között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

1.4.2. A vizsgálati eljárás

1.4.2.1. A vizsgálandó anyag alkalmazása

A vizsgálandó anyagot egy kis (körülbelül 6 cm²-es) bőrterületre kell kijuttatni, majd egy géztapasszal le kell takarni, és nem irritáló ragasztószalaggal kell a helyén rögzíteni. Olyan esetekben, amikor a közvetlen alkalmazás nem megoldható (pl. folyadékok vagy egyes masszák esetében), a vizsgálandó anyagot először a géztapaszra kell felvinni, és azután azt kell a bőrre tenni. Az expozíciós idő tartamára a tapaszt lazán kell a bőrre rögzíteni egy megfelelő félig záró kötés alkalmazásával. Amennyiben a vizsgálandó anyagot a tapaszra viszik fel, úgy kell a bőrre rögzíteni, hogy megfelelő legyen a kontaktus, és az anyag egyenletesen oszoljon el a bőrön. Gondoskodni kell arról, hogy az állat ne férjen hozzá a tapaszhoz és ne nyelje le vagy lélegezze be a vizsgálandó anyagot.

A folyékony vizsgálandó anyagokat általában hígítatlanul kell alkalmazni. Szilárd anyagok vizsgálatakor (amelyeket szükség esetén porrá lehet őrölni) a vizsgálandó anyagot a lehető legkisebb, de a bőrrel való megfelelő kontaktus biztosításához elegendő mennyiségű vízzel (vagy ha szükséges, más megfelelő vivőanyaggal) meg kell nedvesíteni. Ha víztől eltérő vivőanyagot alkalmaznak, a vivőanyag legfeljebb minimális mértékben befolyásolhatja a vizsgálandó anyag által gyakorolt irritáló hatást.

Ha megoldható, az általában 4 órás expozíciós idő végén az adott esetben megmaradt vizsgálandó anyagot vízzel vagy más megfelelő oldószerezrel el kell távolítani, de vigyázni kell arra, hogy ezzel ne legyenek hatással a meglévő válaszreakciókra vagy a felhám épségére.

1.4.2.2. A dózisok

A vizsgálati helyre 0,5 ml folyadékot vagy 0,5 g szilárd anyagot vagy masszát kell felvinni.

1.4.2.3. Kiindulási vizsgálat (*in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálat egy állat felhasználásával)

Nyomatékosan ajánlott, hogy az *in vivo* vizsgálatot először egy állaton végezzék el, különösen akkor, ha az anyag gyaníthatóan korróziós hatású. Ez összhangban áll a lépcsőzetes vizsgálati stratégiával (lásd az 1. mellékletet).

Ha az adatok bizonyító erejének elemzése alapján az anyag korróziós hatásának minősül, nincsen szükség további állatkísérletekre. A legtöbb gyaníthatóan korróziós hatású anyag esetében általában szükségtelen további *in vivo* vizsgálatokat végezni. Ha azonban nincs elegendő bizonyíték, és emiatt indokoltnak látszik a további adatgyűjtés, az alábbi eljárás alkalmazásával korlátozott állatkísérletek végezhetők: az állatra egymást követően legfeljebb három tapaszt kell felhelyezni. Az első tapaszt három perc után el kell távolítani, és ha nem láthatók súlyos bőrreakciók, a második tapaszt is fel kell helyezni, majd egy óra elteltével ezt is el kell távolítani. Ha a megfigyelések ebben a szakaszban azt mutatják, hogy humánusan megengedhető az expozíció négy órára történő meghosszabbítása, egy harmadik tapaszt is fel lehet helyezni, majd négy óra múlva eltávolítani és kiértékelni a válaszreakciót.

Ha a három egymás utáni expozíció bármelyike után korróziós hatás tapasztalható, a vizsgálatot azonnal be kell fejezni. Ha az utolsó tapasz eltávolítása után sem figyelhető meg korróziós hatás, az állatot 14 napon át meg kell figyelni, kivéve, ha előbb jelentkezik korróziós hatás.

Azokban az esetekben, amikor a vizsgálandó anyag várhatóan nem okoz korróziós hatást, de irritáló lehet, négy órára kell felhelyezni egyetlen tapaszt egy állatra.

1.4.2.4. Ellenőrző vizsgálat (*in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálat további állatok alkalmazásával)

Ha a kiindulási vizsgálat során nem figyelhető meg korróziós hatás, legfeljebb további két állaton egy-egy tapasz és négyórás expozíciós idő alkalmazásával meg kell erősíteni az irritációt vagy a negatív válaszreakciókat. Ha a kiindulási vizsgálat során irritációs választ figyeltek meg, az ellenőrző vizsgálatok lépcsőzetesen is elvégezhetők, vagy úgy, hogy

két további állatot egyszerre kezelnek. Abban a kivételes esetben, ha nem végeznek kiindulási vizsgálatot, két vagy három állatot lehet kezelni egy-egy tapasszal, amelyet négy óra után távolítanak el. Ha két állatot használnak, és mindkettő ugyanolyan válaszreakciót mutat, nincs szükség további vizsgálatokra. Egyéb esetben egy harmadik állatot is be kell vonni a vizsgálatba. A nem egyértelmű válaszokat esetleg további állatok alkalmazásával kell értékelni.

1.4.2.5. Megfigyelési időszak

A megfigyelési időszak hosszát úgy kell megválasztani, hogy elegendő legyen a megfigyelt hatások visszafordíthatóságának teljes kiértékelésére. A vizsgálatot azonban azonnal meg kell szakítani, ha az állat tartósan súlyos fájdalom vagy szorongás jeleit mutatja. A hatások visszafordíthatóságának meghatározásához az állatokat a tapaszok eltávolítása után legfeljebb 14 napig meg kell figyelni. Ha a visszafordíthatóság a 14 napos időszak vége előtt bebizonyosodik, a kísérletet ekkor kell befejezni.

1.4.2.6. Klinikai megfigyelések és a bőrreakciók értékelése

Minden állatnál meg kell vizsgálni a bőrpír (eritéma) vagy vizenyő (ödéma) jeleit, továbbá a tapasz eltávolítása után 60 perccel, majd 24, 48 és 72 órával értékelni kell a válaszreakciókat. Az egy állattal végzett kiindulási vizsgálatban a vizsgálati területet a tapasz eltávolítása után azonnal is meg kell vizsgálni. A bőrreakciókat a csatolt táblázatban megadottak szerint kell értékelni és jegyzőkönyvezni. Ha 72 óránál sem irritációként, sem korrózióként nem értékelhető bőrkárosodás látható, a hatások visszafordíthatóságának meghatározásához szükség lehet arra, hogy a megfigyeléseket a 14. napig folytassák. Az irritáció megfigyelésén kívül minden lokális toxikus hatást, mint például a bőr zsírtartalmának csökkentését, és bármely káros szisztémás hatást (pl. a mérgezés klinikai tüneteire és a testtömegre gyakorolt hatást) részletesen le kell írni, és fel kell jegyezni. A nem egyértelmű eredmények tisztázása érdekében fontolóra kell venni kórszövettani vizsgálatok elvégzését is.

A bőrreakciók értékelése elkerülhetetlenül szubjektív. A bőrreakciók értékelésének harmonizálása és a vizsgáló laboratóriumok, illetve a megfigyelésekben és azok értékelésében részt vevők segítése érdekében a megfigyeléseket végző személyzetet megfelelően ki kell képezni az alkalmazott értékelő rendszer (lásd a csatolt táblázatot) használatára. Hasznos lehet egy, a bőrirritációk és más léziók értékelését ismertető, illusztrált útmutató is (9).

2. ADATOK

2.1. Az eredmények bemutatása

A végleges vizsgálati jelentésben a vizsgálatok eredményeit táblázatos formában kell összefoglalni, amelynek a 3.1. szakaszban felsorolt tételek mindegyikét tartalmaznia kell.

2.2. Az eredmények értékelése

A bőrirritációs pontszámokat a léziók jellegével és súlyosságával, illetve visszafordíthatóságával vagy visszafordíthatatlanságával összefüggésben kell értékelni. Az egyes pontszámok nem jelentenek abszolút normát egy anyag irritációs tulajdonságai tekintetében, mivel a vizsgálandó anyag egyéb hatásait is értékelni kell. Az egyes pontszámokat ehelyett referenciaértékeknek kell tekinteni, amelyeket a vizsgálat során tett összes egyéb megfigyeléssel együttesen kell értékelni.

Az irritációs válaszok értékelésekor figyelembe kell venni a bőrléziók visszafordíthatóságát. Ha az olyan válaszok, mint a szőrhiány (korlátozott területen), kóros elszarusodás (hiperkeratózis), a szövetszaporodás (hiperplázia) vagy a hámlás a 14 napos megfigyelési időszak végére sem múlnak el, a vizsgálandó anyagot irritálóknak kell tekinteni.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Az *in vivo* vizsgálatok indoklása: a korábban rendelkezésre álló vizsgálati adatok, ezen belül a lépcsőzetes vizsgálati stratégia során nyert adatok bizonyító erejének elemzése:

- a korábbi vizsgálatból rendelkezésre álló adatok ismertetése;
- a vizsgálati stratégia egyes szakaszaiban nyert adatok;
- az elvégzett *in vitro* vizsgálatok, ezen belül az eljárások, illetve a vizsgálandó anyaggal és a referenciaanyagokkal a kapott eredmények részleteinek ismertetése;
- az adatok bizonyító erejének elemzése az *in vivo* vizsgálat elvégzéséhez.

Vizsgálandó anyag:

- azonosító adatok (pl. CAS-szám; eredet; tisztaság; ismert szennyezők; tételszám);
- fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. pH, illékonyság, oldhatóság, stabilitás);
- elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya.

Vivőanyag:

- megjelölés, (adott esetben) koncentráció, alkalmazott térfogat;
- a vivőanyag megválasztásának indoklása.

Kísérleti állatok:

- az alkalmazott faj/törzs, adott esetben az albínó nyúttól eltérő faj alkalmazásának indoklása;
- az állatok száma ivaronként;
- az egyes állatok testtömege a vizsgálat előtt és után;
- életkor a vizsgálat kezdetén;
- az állatok származása, tartásuk körülményei, takarmánya stb.

Kísérleti körülmények:

- a tapaszt helyének előkészítésére alkalmazott technika;
- a tapaszt anyagának és a felhelyezési technika részletes ismertetése;
- a vizsgálandó anyagból előállított készítménynek, az alkalmazás és az eltávolítás a részletes ismertetése.

Eredmények:

- az irritációs/korróziós válaszok pontszámainak táblázatos formában történő megadása minden egyes állatra és minden egyes mérési időpontra vonatkozóan;
- az összes megfigyelt lézió ismertetése;
- a megfigyelt irritáció vagy korrózió jellegének és mértékének, illetve az esetleges kórszöveti eredmények leíró jellegű ismertetése;
- a bőrirritáción és korróziós hatáson kívüli egyéb káros hatások (pl. a bőr zsírtartalmának csökkenése) és szisztémás hatások ismertetése.

Az eredmények diszkussziója.

4. HIVATKOZÁSOK

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410–429.

(2) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. Toxicol. In Vitro, 2, 19–26.

(3) Worth, A.P., Fentem, J.H., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Liebsch, M. (1998) Evaluation of the proposed OECD Testing Strategy for skin corrosion. ATLA 26, 709–720.

(4) ECETOC (1990) Monograph No. 15, „Skin Irritation”, European Chemical Industry, Ecology and Toxicology Centre, Brussels.

(5) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on *in vitro* tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483–524.

(5a) B40. vizsgálati módszer, Bőrkorrózió.

(6) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).

(7) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).

(8) OECD (2000). Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).

(9) EPA (1990). Atlas of Dermal Lesions, (20T–2004). United States Environmental Protection Agency, Office of Pesticides and Toxic Substances, Washington, DC, August 1990. [Kérésre az OECD Titkárságon rendelkezésre áll.]

I. táblázat

A bőrreakciók értékelése*Bőrpír (eritéma) és pörkképződés*

Nincs bőrpír	0
Nagyon enyhe bőrpír (alig észlelhető)	1
Jól kifejezett bőrpír	2
Közepes-súlyos mértékű bőrpír	3
Pörkképződésig fokozódó súlyos bőrpír (céklavörös szín), amely lehetetlenné teszi a bőrpír osztályozását	4

Lehetséges maximum: 4

Vizenyőképződés

Nincs vizenyő	0
Nagyon enyhe vizenyő (alig észlelhető)	1
Enyhe vizenyő (a terület szélei az egyértelmű kiemelkedések miatt jól kifejezettek)	2
Közepes súlyosságú vizenyő (körülbelül 1 mm-re emelkedik ki)	3
Súlyos vizenyő (több mint 1 mm-re emelkedik ki és nagyobb, mint az expozíciós terület)	4

Lehetséges maximum: 4

A nem egyértelmű válaszokat kórszövettani vizsgálattal lehet tisztázni.

*Melléklet***Lépcsőzetes vizsgálati stratégia bőrirritációs és bőrkorróziós vizsgálatokhoz****ÁLTALÁNOS MEGFONTOLÁSOK**

A tudományos ésszerűség és az állatok kímélete érdekében fontos, hogy elkerülhető legyen az állatokkal való szükségtelen kísérletezés, illetve minimálisra lehessen csökkenteni azokat a vizsgálatokat, amelyek valószínűleg súlyos válaszreakciókat váltanak ki a kísérleti állatokban. Az *in vivo* vizsgálatok fontolóra vétele előtt minden, az anyag potenciális bőrkorróziós/bőrirritáló hatásával összefüggő információt ki kell értékelni. Lehet, hogy elegendő bizonyíték van a vizsgálandó anyag bőrkorróziós és bőrirritációs potenciál alapján történő besorolására anélkül, hogy laboratóriumi állatokon kísérleteket kellene végezni. Az adatok bizonyító erejének elemzésével és a lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával tehát minimálisra csökkenthető az *in vivo* vizsgálatok iránti igény, különösen, ha az anyag valószínűleg súlyos reakciókat okoz.

Az anyagok bőrirritáló és bőrkorróziós hatásával kapcsolatban rendelkezésre álló információk értékelésére célszerű elvégezni az adatok bizonyító erejének elemzését annak érdekében, hogy meg lehessen határozni, hogy az *in vivo* bőrvizsgálatokon kívül szükség van-e egyéb vizsgálatokra az irritáló/korróziós potenciál jellemzéséhez. Ha további vizsgálatokra van szükség, a kísérleti adatok összegyűjtéséhez, a lépcsőzetes vizsgálati stratégiát javasolt alkalmazni. Az olyan anyagok esetében, amelyeket korábban nem vizsgáltak, az anyag bőrkorróziós/bőrirritáló potenciáljának értékeléséhez szükséges adatsor előállításához a lépcsőzetes vizsgálati stratégiát kell alkalmazni. Az ebben a mellékletben ismertetett vizsgálati stratégiát egy OECD-munkaértekezleten (1) dolgozták ki, majd később jóváhagyták, és a Harmonizált integrált veszélyosztályozási rendszer a vegyi anyagok humán egészségügyi és környezeti hatásainak osztályozására keretében kibővítették, és 1998 novemberében a Vegyi Anyag Bizottság és a Vegyi Anyag Munkacsoport 28. együttes ülésén jóváhagyták (2).

Bár ez a lépcsőzetes vizsgálati stratégia nem képezi szerves részét a B.4. vizsgálati módszernek, kifejezésre juttatja a bőrirritáció/bőrkorrózió jellemzőinek meghatározására ajánlott megközelítést. Ez a megközelítés testesíti meg a legjobb gyakorlatot, és etikai szempontból is irányadó az *in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálatokhoz. A vizsgálati módszer útmutatást ad az *in vivo* vizsgálatok elvégzéséhez, és összefoglalja azokat a tényezőket, amelyeket az ilyen vizsgálatok megkezdése előtt fontolóra kell venni. A stratégia megközelítést biztosít a vizsgálandó anyag bőrirritáló/bőrkorróziós

tulajdonságaival kapcsolatos meglévő adatok értékeléséhez, és lépcsőzetes megközelítést jelent az olyan anyagokra vonatkozó adatok összegyűjtéséhez, amelyekhez további vizsgálatokra van szükség, vagy amelyeket korábban egyáltalán nem vizsgáltak. Javaslatot tesz továbbá validált és elfogadott *in vitro* vagy *ex vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálatok meghatározott körülmények esetén történő elvégzésére.

AZ ÉRTÉKELÉSI ÉS VIZSGÁLATI STRATÉGIA ISMERTETÉSE

A vizsgálatoknak a lépcsőzetes vizsgálati stratégia (ábra) keretében történő elvégzése előtt minden rendelkezésre álló információt ki kell értékelni annak meghatározása érdekében, hogy szükség van-e *in vivo* bőrvizsgálatokra. Bár egy-egy paraméter (pl. szélsőséges pH-érték) vizsgálatából is jelentős mennyiségű információ nyerhető, az összes rendelkezésre álló információt figyelembe kell venni. A kérdéses anyag vagy analógjai hatásaival kapcsolatos összes adatot értékelni kell azok bizonyító erejéről való döntés meghozatalakor, és meg is kell indokolni ezt a döntést. Elsődleges hangsúlyt kell fektetni az anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló humán és állatkísérletes adatokra, ezt követően az *in vitro* vagy *ex vivo* vizsgálatok eredményére. Lehetőség szerint kerülni kell a korróziós hatású anyagok *in vivo* vizsgálatát. A vizsgálati stratégia során figyelembe veendő tényezők a következők:

A rendelkezésre álló humán és állatkísérletes adatok értékelése (1. lépés). Első lépésben a rendelkezésre álló humán adatokat, pl. klinikai vagy munkaegészségügyi vizsgálatokat, valamint esettanulmányokat és/vagy állatkísérletes adatokat, pl. egyszeri vagy ismételt bőrexpozíciós toxicitási vizsgálatokat kell kiértékelni, mivel ezek a bőrre gyakorolt hatásokra közvetlenül vonatkozó információkat szolgáltatnak. Az ismerten irritáló vagy korróziós hatású anyagokat, illetve azokat, amelyek esetében egyértelműen bizonyítható az ilyen hatások hiánya, nem szükséges *in vivo* vizsgálni.

A szerkezet-aktivitási összefüggések (SAR) elemzése (2. lépés). Ha vannak, fontolóra kell venni szerkezetileg rokon anyagok vizsgálatát. Ha a szerkezetileg rokon anyagokkal vagy elegyeikkel kapcsolatban elegendő olyan humán és/vagy állatkísérletes adat áll rendelkezésre, amely valószínűsíti a bőrkorróziós/bőrirritációs potenciált, feltételezhető, hogy az értékelés alatt álló vizsgálandó anyag ugyanilyen válaszreakciókat vált ki. Ilyen esetekben előfordulhat, hogy a vizsgálandó anyagot nem kell megvizsgálni. A lépcsőzetes vizsgálati stratégia értelmében a szerkezetileg rokon anyagok vagy elegyeik vizsgálatából származó negatív adatok nem jelentenek elegendő bizonyítékot arra nézve, hogy az anyag nem korróziós hatású vagy nem irritáló. A bőrkorróziós és bőrirritáló potenciál meghatározására validált és elfogadott SAR-megközelítéseket kell alkalmazni.

Fizikai-kémiai tulajdonságok és kémiai reaktivitás (3. lépés). A szélsőséges, például pH 2,0 és 11,5 kémhatású anyagok erőteljes lokális hatást gyakorolhatnak. Ha a szélsőséges pH-érték az alapja annak, hogy egy anyagot korróziós hatásúnak minősítsünk, akkor az anyag sav/alkáli tartalmát (vagy pufferkapacitását) is figyelembe lehet venni (3) (4). Ha a pufferkapacitás alapján valószínűsíthető, hogy az anyag nem bőrkorróziós hatású, akkor ennek megerősítésére további vizsgálatokat kell végezni, lehetőleg validált és elfogadott *in vitro* vagy *ex vivo* módszerek alkalmazásával (lásd az 5. és 6. lépést).

Dermális toxicitás (4. lépés). Ha egy vegyületről kiderül, hogy dermális alkalmazás esetén nagyon toxikus, előfordulhat, hogy az anyag *in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálata nem oldható meg, mivel a vizsgálandó anyag szokásosan alkalmazott mennyisége meghaladhatja a nagyon mérgező dózist, és ennek következtében az állatok elhullását vagy súlyos szenvedését okozhatja. Emellett, ha a 2000 mg/testtömeg-kg-os határdózisig vagy annál magasabb dózisok alkalmazásával korábban már végeztek albínó nyulakban *in vivo* dermális toxicitási vizsgálatokat, és nem tapasztaltak bőrirritációt vagy bőrkorróziót, előfordulhat, hogy nem lesz szükség további bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálatokra. A korábbi vizsgálatok akut dermális toxicitási eredményeinek értékelésekor egy sor megfontolást kell figyelembe venni. Előfordulhat például, hogy a bőrléziókkal kapcsolatos adatok hiányosak. Esetleg nem nyúlón végezték a vizsgálatokat és a megfigyeléseket, és a különböző állatfajokban nagyon eltérő lehet a válaszreakciók érzékenysége. Illetve lehetséges, hogy az állatokon alkalmazott vizsgálandó anyag formája nem volt alkalmas a bőrirritáció/bőrkorrózió vizsgálatára [pl. a dermális toxicitási vizsgálatokban alkalmazott hígítás miatt (5)]. Azokban az esetekben azonban, ahol jól megtervezett és lefolytatott dermális toxicitási vizsgálatokat végeztek nyulakon, a negatív eredményeket elegendő bizonyítéknak tekinthetjük arra, hogy az anyag nem korróziós hatású és nem irritáló.

In vitro vagy ex vivo vizsgálatok eredményei (5. és 6. lépés). Nem kell állatokon kísérletezni olyan anyagokkal, amelyek e konkrét hatások meghatározására tervezett, validált és elfogadott módszerekkel végzett *in vitro* vagy *ex vivo* vizsgálatokban (6) (7) korróziós vagy súlyos irritáló hatásokat mutattak. Ilyen esetben fel lehet tételezni, hogy az anyag *in vivo* is hasonlóan súlyos hatásokat vált ki.

In vivo vizsgálat nyulakban (7. és 8. lépés). Ha az adatok bizonyító erejének elemzése alapján hozott döntés szerint *in vivo* vizsgálatokat kell végezni, első lépésben egyetlen állattal kiindulási vizsgálatot kell végezni. Ha e vizsgálat eredménye szerint az anyag bőrkorróziós hatású, nem szabad további vizsgálatokat végezni. Ha a kiindulási vizsgálatban nem tapasztalható korróziós hatás, az irritációs vagy negatív választ legfeljebb két további állat négyórás expozíciójával ellenőrizni kell. Ha a kiindulási vizsgálatban irritáció tapasztalható, az ellenőrző vizsgálat végezhető lépcsőzetesen is, vagy úgy is, hogy a két további állatot egyszerre kezelnek.

HIVATKOZÁSOK

(1) OECD (1996). Test Guidelines Programme: Final Report on the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held on Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).

(2) OECD (1998). Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).

(3) Worth, A.P., Fentem J.H., Balls M., Botham P.A., Curren R.D., Earl L.K., Esdail D.J., Liebsch M. (1998). An Evaluation of the Proposed OECD Testing Strategy for Skin Corrosion. ATLA 26, 709–720.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth, W.M.H. (1988). Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substances, Without Testing on Animals. Toxic In Vitro, 2 (1) pp 19–26.

(5) Patil, S.M., Patrick, E., Maibach, H.I. (1996) Animal, Human, and In Vitro Test Methods for Predicting Skin Irritation, in: Francis N. Marzulli and Howard I. Maibach (editors): Dermatotoxicology. Fifth Edition ISBN 1–56032–356–6, Chapter 31, 411–436.

(6) B40. vizsgálati módszer

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Esdail, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483–524.

Ábra

Vizsgálati és kiértékelési stratégia a bőrirritáció, illetve a bőrkorrózió vizsgálatához

Tevékenység	Eredmény	Következtetés
1. A meglévő humán és/vagy állatkísérletes adatok szerint hatással van a bőrre vagy a nyálkahártyára	Korróziós hatású Irritáló hatású Nem korróziós / nem irritáló hatású	Csúcs végpont; korróziós hatásnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra. Csúcs végpont; irritáló hatásnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra. Csúcs végpont; nem korróziós és nem irritáló hatásnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra.
<i>Nincs információ, vagy van, de nem meggyőző</i>		
2. SAR-értékelést kell végezni a bőrkorrózióra/bőrirritációra vonatkozóan	Súlyos bőrkárosodást jelez előre Bőrirritációt jelez előre	Korróziós hatásnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra. Irritáló hatásnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra.
<i>Nem lehet előrejelzést tenni, vagy az előrejelzések nem meggyőzőek vagy negatívak</i>		
3. Meg kell mérni a pH-t (adott esetben figyelembe kell venni a pufferkapacitást is)	pH 2 vagy 11,5 (nagy pufferkapacitással, amennyiben ez lényeges)	Fel kell tételezni, hogy korróziós hatású. Nincs szükség vizsgálatokra.

	<i>Tevékenység</i>	<i>Eredmény</i>	<i>Következtetés</i>
	<i>2 < pH < 11,5, vagy pH 2 vagy pH 11,5 alacsony vagy nulla pufferkapacitással, amennyiben ez lényeges</i>		
4.	Ki kell értékelni a dermális alkalmazás esetén mérhető szisztémás toxicitást ¹	Nagyon mérgező 2000 mg/testtömeg-kg vagy annál magasabb határdózissal nyulakon vizsgálva nem korróziós vagy irritáló hatású	Nincs szükség további vizsgálatokra. Fel kell tételezni, hogy nem korróziós vagy irritáló hatású. Nincs szükség további vizsgálatokra.
	<i>Nincs ilyen információ, vagy van, de nem meggyőző</i>		
5.	El kell végezni egy validált <i>in vitro</i> vagy <i>ex vivo</i> bőrkorróziós vizsgálatot	Korróziós hatásra utaló válasz	<i>In vivo</i> korróziós hatást kell feltételezni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
	<i>Az anyag nem korróziós hatású</i>		
6.	El kell végezni egy validált <i>in vitro</i> vagy <i>ex vivo</i> bőrirritációs vizsgálatot	Irritáló válasz	<i>In vivo</i> irritációt kell feltételezni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
	<i>A bőrirritációs vizsgálatra még nincsenek validált <i>in vitro</i> vagy <i>ex vivo</i> vizsgálati módszerek, vagy az anyag nem irritáló hatású</i>		
7.	Egyetlen nyúlra el kell végezni az előzetes <i>in vivo</i> vizsgálatot	Súlyos bőrkárosodás	Korróziós hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
	<i>Nincs súlyos károsodás</i>		
8.	Egy vagy két további állaton el kell végezni az ellenőrző vizsgálatot	Korróziós hatású vagy irritáló Nem korróziós vagy irritáló hatású	Korróziós hatásúnak vagy irritálóknak kell tekinteni. Nincs szükség további vizsgálatokra. Nem korróziós és nem irritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség további vizsgálatokra.

¹ A 2. és a 3. lépés előtt is el lehet végezni.

5. számú melléklet az 56/2005. (XI. 29.) EüM–KvVM–BM együttes rendelethez

B.5. AKUT TOXICITÁS: SZEMIRRITÁCIÓ/SZEMKORRÓZIÓS HATÁS

1. MÓDSZER

Ez a módszer egyenértékű az OECD TG 405 (2002) módszerrel.

1.1. Bevezetés

Ennek a továbbfejlesztett módszernek a kidolgozása során külön figyelmet szenteltek a vizsgálandó anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló összes információ kiértékelése révén lehetségessé váló javító beavatkozásoknak, hogy ezáltal elkerülhető legyen a laboratóriumi állatokon történő szükségtelen kísérletezés, és így tiszteletben lehessen tartani az állatjóléti szempontokat is. A módszer ajánlást fogalmaz meg arra nézve, hogy az anyag akut szemkorróziós vagy szemirritáló hatásának vizsgálatára előírt *in vivo* kísérlet elvégzése előtt el kell végezni a rendelkezésre álló adatok bizonyító erejének elemzését (1). Ha nem áll rendelkezésre elegendő adat, akkor ajánlott lépcsőzetes vizsgálatok alkalmazásával bővíteni ezeket (2) (3). A vizsgálati stratégia részét képezi validált és elfogadott *in vitro* vizsgálatok végzése, amelyek a vizsgálati módszer mellékleteként kerülnek ismertetésre. Ajánlott továbbá, hogy az *in vivo* szemvizsgálatok tervbevétele előtt a szemkorróziós hatás előrejelzésére végezzenek *in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálatot.

A tudományos ésszerűség és az állatok kímélete érdekében nem szabad *in vivo* vizsgálatokat végezni mindaddig, amíg az anyag potenciális szemkorróziós/irritáló hatására vonatkozó összes rendelkezésre álló adatra vonatkozóan el nem végezték az adatok bizonyító erejének elemzését. Ilyen adatok az embereken és/vagy laboratóriumi állatokon elvégzett vizsgálatok eredményei, a szerkezetileg rokon anyagok vagy elegyeik korróziós/irritáló hatásaival kapcsolatos tények, az anyag erős savasságát vagy lúgosságát igazoló adatok (4) (5), valamint a validált és elfogadott *in vitro* vagy *ex vivo* bőrkorróziós és bőrirritációs vizsgálatokból kapott eredmények (6), (6a). Előfordulhat, hogy a vizsgálatokat már az adatok bizonyító erejének elemzése előtt elvégezték vagy éppen annak eredményeként végzik el.

Bizonyos anyagok esetében az ilyen elemzés annak a szükségét jelezheti, hogy el kell végezni az anyag szemkorróziós/szemirritációs potenciáljának *in vivo* vizsgálatát. Minden ilyen esetben, az *in vivo* szemvizsgálat alkalmazásának tervbevétele előtt először lehetőleg el kell végezni, és ki kell értékelni egy *in vivo* vizsgálatot az anyag bőrre gyakorolt hatásainak meghatározására a B.4. vizsgálati módszer (7) alkalmazásával. Az adatok bizonyító erejének elemzése és a lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazása csökkenti az *in vivo* szemkorróziós/szemirritációs vizsgálatok szükségességét azoknak az anyagoknak az esetében, amelyekhez más vizsgálatokból elegendő bizonyíték áll rendelkezésre. Ha a lépcsőzetes stratégia alkalmazásával nem határozható meg a szemkorróziós/irritációs potenciál, még az *in vivo* bőrkorróziós és irritációs vizsgálat elvégzése után sem, elvégezhető egy *in vivo* szemkorróziós/szemirritációs vizsgálat.

A preferált lépcsőzetes vizsgálati stratégia, amely magában foglalja validált *in vitro* vagy *ex vivo* korróziós/irritációs vizsgálatok elvégzését is, az e vizsgálati módszerhez csatolt mellékletben kerül ismertetésre. A stratégiát egy OECD-munkaértekezlet (8) résztvevői dolgozták ki, javasolták egyhangúlag, majd fogadták el mint a Vegyi anyagok osztályozásának és címkézésének egyetemes harmonizált rendszere (GHS) (9) ajánlott vizsgálati stratégiáját. Az *in vivo* vizsgálatok elvégzése előtt ezt a vizsgálati stratégiát javasolt követni. Új anyagok esetében ez az ajánlott lépcsőzetes vizsgálati megközelítés az anyag korróziós/irritáló hatásaira vonatkozó, tudományos szempontból megfelelő adatok gyűjtésére. Ismert anyagok esetében, ha nem áll rendelkezésre elegendő adat a szemkorróziós/szemirritáló és bőrkorróziós/bőrirritáló hatásokról, ennek a stratégiának az alkalmazásával kell pótolni a hiányzó adatokat. Megfelelően meg kell indokolni, ha ettől eltérő vizsgálati stratégiát vagy eljárást alkalmaznak, vagy ha úgy döntenek, hogy nem használják a lépcsőzetes vizsgálati megközelítést.

1.2. Fogalommeghatározások

»*Szemirritáció*«: a vizsgálandó anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül teljes mértékben visszafordítható szemelváltozások.

»*Szemkorróziós hatás*«: a vizsgálandó anyagnak a szem elülső felszínén történő alkalmazását követően megjelenő és az alkalmazástól számított 21 napon belül nem teljes mértékben visszafordítható szövetkárosodások a szemben, vagy súlyos fizikai látóképesség-romlás.

1.3. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálandó anyagot egyetlen dózisban kell alkalmazni a kísérleti állat egyik szemén; a másik, nem kezelt szem szolgál kontrollként. A szemirritáció/szemkorrózió mértékét meghatározott időközönként a kötőhártya, szaruhártya és szivárványhártya lézióinak pontozásával kell kiértékelni. A hatások teljes kiértékelése érdekében részletesen ismertetni kell a szemre gyakorolt egyéb hatásokat és a káros szisztémás hatásokat is. A vizsgálat időtartamának elég hosszúnak kell lennie ahhoz, hogy meg lehessen határozni a hatások visszafordíthatóságát vagy visszafordíthatatlanságát.

A vizsgálat bármely fázisában tartósan súlyos szorongás és/vagy fájdalom jeleit mutató állatokat humánus módon ex-terminálni kell, és az anyagot ennek megfelelően kell értékelni. Az elhullás közelében lévő és súlyosan szenvedő állatok humánus módon történő exterminálásáról szóló döntéssel kapcsolatos kritériumok a (10) hivatkozásban találhatók.

1.4. A vizsgálati módszer ismertetése

1.4.1. Az *in vivo* vizsgálat előkészítése

1.4.1.1. Az állatfaj kiválasztása

A preferált laboratóriumi állatfaj az albínó nyúl, és egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell alkalmazni. Más fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell.

1.4.1.2. Az állatok előkészítése

A vizsgálat előtt legfeljebb 24 órával a vizsgálatra előzetesen kiválasztott kísérleti állat mindkét szemét meg kell vizsgálni. Nem szabad olyan állatot használni, amely szemirritációt, szemhibákat vagy korábban szerzett szaruhártya-sérülést mutat.

1.4.1.3. Az állatok tartásának és etetésének körülményei

Az állatokat egyedileg kell elhelyezni. Nyulak esetében a kísérleti helyiség hőmérsékletének 20 °C (± 3 °C)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30%-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70%-ot, a célértéknek 50 és 60% között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

1.4.2. Vizsgálati eljárás

1.4.2.1. A vizsgálandó anyag alkalmazása

A vizsgálandó anyagot az alsó szemhéj óvatos elhúzása után az állat egyik szemének kötőhártyaszákjába kell bejuttatni. Ezt követően körülbelül egy másodpercig óvatosan össze kell fogni a szemhéjakat, hogy az anyag ki ne essen vagy folyjon. A másik, nem kezelt szem kontrollként szolgál.

1.4.2.2. Öblögetés

A kísérleti állatok szemét a vizsgálandó anyag becseppentése után legalább 24 órán át nem szabad kimosni, kivéve szilárd anyagok alkalmazása esetén (l. 1.4.2.3.2. szakasz), illetve ha azonnali korróziós hatás vagy irritáció tapasztalható. Ha szükségnek tűnik, 24 óra múlva ki lehet mosni az állatok szemét.

Nem javasolt kontrollcsoport alkalmazása a mosás hatásának vizsgálatára, kivéve, ha az tudományosan indokolt. Ha kontrollcsoport szükséges, akkor ehhez két nyulat kell használni. A mosás körülményeit, pl. a mosás időpontját, a mosóoldat összetételét és hőmérsékletét, a mosás időtartamát és sebességét, valamint az alkalmazott térfogatot részletesen dokumentálni kell.

1.4.2.3. A dózisok

1.4.2.3.1. Folyadékok vizsgálata

Folyadékok vizsgálata esetén 0,1 ml-es dózist kell alkalmazni. Pumpás spray-eket nem szabad az anyag közvetlenül a szembe való permetezésére használni. A sprayt ki kell fújni, és tartalmát egy edényben össze kell gyűjteni, mielőtt 0,1 ml-t az állat szemébe cseppentenének.

1.4.2.3.2. Szilárd anyagok vizsgálata

Szilárd anyagok, masszák és szemcsés anyagok vizsgálata esetén az alkalmazott mennyiségnek 0,1 ml térfogatúnak kell lennie, illetve tömege nem haladhatja meg a 100 g-ot. A vizsgálandó anyagot finom porrá kell őrölni és térfogatmérés előtt óvatosan össze kell tömöríteni, pl. úgy, hogy a mérőedényt megkocogtatják. Amennyiben az első megfigyelési időpontban vagy a kezelés után 1 órával azt tapasztalják, hogy a szilárd vizsgálandó anyagot a fiziológiai mechanizmusok nem távolították el a kísérleti állat szeméből, a szemet sóoldattal vagy desztillált vízzel ki lehet öblögetni.

1.4.2.3.3. Aeroszolkok vizsgálata

Ajánlatos minden pumpás spray tartalmát és aeroszolt összegyűjteni, mielőtt a szembe cseppentenék. Az egyetlen kivételt ez alól a túlnyomásos aeroszolos flakonokban lévő anyagok képezik, amelyeket a párolgás miatt nem lehet összegyűjteni. Ilyen esetekben az állat szemét nyitva kell tartani, és a vizsgálandó anyagot úgy kell a szembe juttatni, hogy a flakont 10 cm távolságban közvetlenül a szem előtt tartva és körülbelül egy másodpercig működtetve egyszer belefújnak az állat szemébe. A spray nyomásától és tartamától függően a távolság ettől eltérő is lehet. Vigyázni kell arra, hogy a spray nyomása ne okozzon szemkárosodást. Megfelelő esetekben szükség lehet arra is, hogy a spray okozta »mechanikai« szemkárosodás lehetőségét is vegyék figyelembe.

Az aeroszol dózist úgy lehet megbecsülni, hogy a vizsgálatot az alábbiak szerint szimulálják. Az anyagot mérőpapírra permetezik egy olyan, közvetlenül a papír elé helyezett nyíláson keresztül, amelynek mérete megegyezik a nyúl szemének méretével. A papír tömegének növekedését használják fel a szembe permetezett mennyiség közelítő becslésére. Illékony anyagok esetében a dózist úgy lehet megbecsülni, hogy vizsgálandó anyag eltávolítása előtt és után is megméri a befogadó edény tömegét.

1.4.2.4. Kiindulási vizsgálat (*in vivo* szemirritációs/szemkorróziós vizsgálat egy állat alkalmazásával)

Ahogy az a lépcsőzetes vizsgálati stratégiában (l. 1. melléklet) is kifejtésre kerül, nyomtatékosan ajánlott, hogy az *in vivo* vizsgálatot először egy állaton végezzék el, különösen akkor, ha az anyag gyaníthatóan korróziós hatású.

Ha e vizsgálat eredményei szerint az ismertetett eljárás alkalmazásával az anyag korróziós hatású vagy súlyosan irritálja a szemet, nem szabad további szemirritációs vizsgálatokat végezni.

1.4.2.5. Helyi érzéstelenítőszer

Esetenként helyi érzéstelenítőszer is alkalmazható. Ha az adatok bizonyító erejének elemzése szerint az anyag fájdalmat okozhat, vagy ha a kiindulási vizsgálat alapján fájdalmas reakció várható, a vizsgálandó anyag becseppentése előtt helyi érzéstelenítőszer alkalmazható. A helyi érzéstelenítőszer típusát, koncentrációját és dózisát körültekintően kell megválasztani, hogy alkalmazása miatt nehegy megváltozzon a vizsgálandó anyag által kiváltott reakció. A kontrollszemet ugyanígy érzésteleníteni kell.

1.4.2.6. Ellenőrző vizsgálat (*in vivo* szemirritációs vizsgálat további állatok alkalmazásával)

Ha a kiindulási vizsgálat során nem figyelhető meg korróziós hatás, legfeljebb további két állat alkalmazásával ellenőrizni kell az irritációs vagy negatív válaszreakciókat. Ha a kiindulási vizsgálat során súlyos irritációs választ figyeltek meg, amely valószínűsíti, hogy az ellenőrző vizsgálatban erőteljes (visszafordíthatatlan) hatás jelentkezhet, ajánlatos az ellenőrző vizsgálatot lépcsőzetesen, egyszerre egy állat alkalmazásával végezni ahelyett, hogy a két további állatot egyszerre kezelnének. Ha a második állat korróziós vagy súlyos, irritáló hatásokat jelez, nem szabad folytatni a vizsgálatokat. A gyenge vagy közepes mértékű irritáció megerősítéséhez további állatok vizsgálatára lehet szükség.

1.4.2.7. Megfigyelési időszak

A megfigyelési időszak hosszát úgy kell megválasztani, hogy elegendő legyen a megfigyelt hatások mértékének és visszafordíthatóságának teljes kiértékelésére. A vizsgálatot azonban azonnal meg kell szakítani, ha az állat tartósan súlyos fájdalom vagy szorongás jeleit mutatja (9). A hatások visszafordíthatóságának meghatározásához az állatokat általában a vizsgálandó anyag alkalmazása után 21 napig kell megfigyelni. Ha a visszafordíthatóság a 21 napos időszak vége előtt bebizonyosodik, a kísérletet ekkor be kell fejezni.

1.4.2.7.1. Klinikai megfigyelések és a bőrreakciók értékelése

A szemeket a vizsgálandó anyag alkalmazása után 1, 24, 48 és 72 órával kell megvizsgálni. Ha már megvan a döntő információ, az állatokat nem szabad a szükségesnél hosszabb ideig a kísérletben tartani. A tartósan súlyos fájdalmat vagy szorongást mutató állatokat haladéktalanul és humánus módon exterminálni kell, és az anyagot ennek megfelelően kell értékelni. A vizsgálandó anyag becseppentése után az alábbi szemléziókat mutató állatokat humánus módon exterminálni kell: szaruhártya perforálódás vagy jelentős mértékű szaruhártya-fekélyesedés, ezen belül staphylooma (a szaruhártya rendellenes kidomborodása); vér jelenléte a szem elülső szemzugában; 48 órán át tartó negyedfokú szaruhártya-homály; a fényreflex 72 órán át tartó hiánya (másodfokú szivárványhártya-válaszreakció); a kötőhártya fekélyesedése; a kötőhártyában vagy a pislogóhártyában jelentkező szövetelhalás; vagy pörkképződés. Erre azért van szükség, mert az ilyen léziók általában nem visszafordíthatók.

A szemléziókat nem mutató állatokat legkorábban a becseppentés után 3 nappal lehet exterminálni. Az enyhe vagy közepes léziókat mutató állatokat legalább addig megfigyelés alatt kell tartani, amíg a léziók meg nem szűnnek, vagy legfeljebb 21 napig, amikor a vizsgálatot be kell fejezni. A 7., 14. és 21. napon kell megfigyeléseket végezni a léziók állapotának és visszafordíthatóságának vagy visszafordíthatatlanságának meghatározására.

Minden egyes vizsgálatkor minősíteni kell, és fel kell jegyezni a szemreakciókat (kötőhártya-, szaruhártya- és szivárványhártya-reakciók) (I. táblázat). A szem bármely egyéb lézióját (pl. pannus, elszíneződés) vagy a káros szisztémás hatásokat is fel kell jegyezni.

A reakciók vizsgálatát megkönnyítheti egy binokuláris kézi nagyító, egy kézi vonalfénylámpa, egy biomikroszkóp vagy bármely más megfelelő eszköz alkalmazása. A 24 óra után tett megfigyelések rögzítése után a szemeket fluoreszcen segítségével is megvizsgálhatjuk.

A szemreakciók értékelése elkerülhetetlenül szubjektív. A szemreakciók értékelésének harmonizálása és a vizsgáló laboratóriumok, illetve a megfigyelésekben és azok értékelésében részt vevők segítése érdekében a megfigyeléseket végző személyzetet megfelelően ki kell képezni az alkalmazott értékelő rendszer használatára.

2. ADATOK

2.1. Az eredmények értékelése

A szemirritációs pontszámokat a léziók jellegével és súlyosságával, illetve visszafordíthatóságukkal vagy visszafordíthatatlanságukkal összefüggésben kell meghatározni. Az egyes pontszámok nem jelentenek abszolút normát egy anyag irritációs tulajdonságai tekintetében, mivel a vizsgálandó anyag egyéb hatásait is értékelni kell. Az egyes pontszámokat ehelyett referenciaértékeknek kell tekinteni, amelyeknek csak akkor van jelentőségük, ha az összes megfigyelés ismertetése és értékelése alátámasztja ezeket.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Az *in vivo* vizsgálatok indoklása: a korábban rendelkezésre álló vizsgálati adatok, ezen belül a lépcsőzetes vizsgálati stratégia során nyert adatok bizonyító erejének elemzése:

- a korábbi vizsgálatból rendelkezésre álló vonatkozó adatok ismertetése;
- a vizsgálati stratégia egyes szakaszaiban nyert adatok;
- az elvégzett *in vitro* vizsgálatok, ezen belül az eljárások, illetve a vizsgálandó anyaggal és a referenciaanyagokkal a kapott eredmények részleteinek ismertetése;
- az elvégzett *in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálatok és a kapott eredmények ismertetése;
- az adatok bizonyító erejének elemzése az *in vivo* vizsgálat elvégzéséhez.

Vizsgálandó anyag:

- azonosító adatok (pl. CAS-szám, eredet; tisztaság, ismert szennyezők, tételszám);
- fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. pH, illékonyság, oldhatóság, stabilitás, vízzel való reakcióképesség);
- elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya;
- helyi érzéstelenítő alkalmazása esetén a szer neve, tisztasága, típusa, dózisa, valamint a vizsgálandó anyaggal való esetleges kölcsönhatása.

Vivőanyag:

- név, (adott esetben) koncentráció, alkalmazott térfogat;
- a vivőanyag megválasztásának indoklása.

Kísérleti állatok:

- az alkalmazott faj/törzs, adott esetben az albínó nyúlól eltérő faj alkalmazásának indoklása;
- az egyes állatok életkora a vizsgálat kezdetén;
- az állatok száma ivaronként a vizsgálati és kontrollcsoportokban (ha szükséges);
- az egyes állatok testtömege a vizsgálat előtt és után;
- származás, tartási körülmények, takarmány stb.

Eredmények:

- az irritáció pontozására az egyes megfigyelési időpontokban alkalmazott módszer (pl. kézi vonalfénylámpa, biomikroszkóp, fluoreszcen) ismertetése;
- az irritációs/korróziós válaszreakció-adatok táblázatos megjelenítése minden állatra vonatkozóan minden megfigyelési időpontban egészen az állatoknak a vizsgálatból való kivételéig;
- a megfigyelt irritáció vagy korrózió jellegének és mértékének leíró jellegű ismertetése;
- a szemben megfigyelt bármely egyéb lézió (pl. vaszkularizáció, pannusképződés, összetapadások, elszíneződés) ismertetése;
- a szemben kívül jelentkező káros lokális és szisztémás hatások, illetve adott esetben a kórszövettani eredmények ismertetése.

Az eredmények diszkussziója.

3.2. Az eredmények értelmezése

A laboratóriumi állatokon végzett szemirritációs vizsgálatok eredményeinek emberre extrapolálása csak korlátozott érvényességű. Az albínó nyúl sok esetben érzékenyebb a szemirritáló vagy -korróziós anyagokra, mint az ember.

Vigyázni kell, hogy az adatok értelmezése során kizárható legyen a másodlagos fertőzés eredményeként jelentkező irritáció lehetősége.

4. HIVATKOZÁSOK

(1) Barratt, M.D., Castell, J.V., Chamberlain, M., Combes, R.D., Dearden, J.C., Fentem, J.H., Gerner, I., Giuliani, A., Gray, T.J.B., Livingston, D.J., Provan, W.M., Rutten, F.A.J.J.L., Verhaar, H.J.M., Zbinden, P. (1995) The Integrated Use of Alternative Approaches for Predicting Toxic Hazard. ECVAM Workshop Report 8. ATLA 23, 410–429.

(2) de Silva, O., Cottin, M., Dami, N., Roguet, R., Catroux, P., Toufic, A., Sicard, C., Dossou, K.G., Gerner, I., Schlede, E., Spielmann, H., Gupta, K.C., Hill, R.N. (1997) Evaluation of Eye Irritation Potential: Statistical Analysis and Tier Testing Strategies. Food Chem. Toxicol 35, 159–164.

(3) Worth A.P. and Fentem J.H. (1999) A general approach for evaluating stepwise testing strategies ATLA 27, 161–177.

(4) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *Toxicol. In Vitro*, 2, 19–26.

(5) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. *J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol.* 12, 227–231.

(6) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsaile, D.J., Holzhutter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. *Toxicology in Vitro* 12, pp. 483–524.

(6a) B40. vizsgálati módszer, Bőrkorróziós hatás.

(7) B4. vizsgálati módszer, Akut toxicitás: bőrirritáció/korrózió.

(8) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www.oecd.org/ehs/test/background.htm>).

(9) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).

(10) Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Humane Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation. OECD Environmental Health and Safety Publications. Series on Testing and Assessment No. 19 (<http://www.oecd.org/ehs/test/monos.htm>).

I. táblázat

A szemlézők osztályozása

Szaruhártya

Homályosság: a homályosság mértéke (az érték megállapításához a legsűrűbb területet kell venni) (*)

Nem észlelhető fekélyesedés vagy homályosság	0
Szórványos vagy diffúz homályos területek (a megszokott csillogás enyhe tompulásán kívül), a szivárványhártya részletei tisztán láthatók	1
Könnyen kivehető áttetsző terület; a szivárványhártya részletei kissé elhomályosodottak	2
Gyöngyházfényű terület; a szivárványhártya semmilyen részlete nem látható; a pupilla mérete alig észlelhető	3
Nem átlátszó szaruhártya; a szivárványhártya egyáltalán nem látható	4

Lehetséges maximum: 4

(*) A szaruhártya homályos területének nagyságát kell feljegyezni.

Szivárványhártya

Normális	0
Észrevehetően mélyebb redők, vérbőség, duzzanat, mérsékelt vérbőség a szaruhártya körül; vagy belövelltség; a szivárványhártya fényre reagál (a lassú reakció is pozitív)	1
Vérzés, nagymérvű roncsolódás, vagy nem reagál a fényre	2

Lehetséges maximum: 2

Kötőhártya

Vörösödés (a szemhéjak és a szegélyező kötőhártyájára vonatkozik; kivéve a szaruhártyát és a szivárványhártyát)

Normális	0
Egyes vérerek vérteltek (belövelltek)	1
Diffúz, bíborvörös szín; az egyes vérerek nehezen kivehetők	2
Diffúz erőteljes vörös	3

Lehetséges maximum: 3

Kötőhártya-vizenyő (chemosis)

Duzzanat (a szemhéjak és/vagy a pislogóhártyák esetében)

Normális	0
A normálisnál kissé duzzadtabb	1
Nyilvánvaló duzzanat, a szemhéjak részleges kifordulásával	2
Duzzanat, nagyjából félig zárt szemhéjakkal	3
Duzzanat, és a szemhéjak több mint félig zárva vannak	4

Lehetséges maximum: 4

*Melléklet***Lépcsőzetes vizsgálati stratégia szemirritáció és szemkorróziós hatás vizsgálatához***ÁLTALÁNOS MEGFONTOLÁSOK*

A tudományos ésszerűség és az állatok kímélete érdekében fontos, hogy elkerülhető legyen az állatokkal való szükségtelen kísérletezés, illetve minimálisra lehessen csökkenteni azoknak a vizsgálatoknak a számát, amelyek valószínűleg súlyos válaszreakciókat váltanak ki a kísérleti állatokban. Az *in vivo* vizsgálatok fontolóra vétele előtt minden, az anyag potenciális szemirritáló/-korróziós hatásával összefüggő információt ki kell értékelni. Lehet, hogy elegendő bizonyíték van a vizsgálandó anyag szemirritációs vagy -korróziós potenciál szempontjából történő besorolására anélkül, hogy laboratóriumi állatokon kísérleteket kellene végezni. Az adatok bizonyító erejének elemzésével és a lépcsőzetes vizsgálati stratégia alkalmazásával tehát minimálisra csökkenthető az *in vivo* vizsgálatok szükségszerűsége, különösen, ha az anyag valószínűleg súlyos reakciókat okoz.

Az anyagok szemirritáló és -korróziós hatásával kapcsolatban rendelkezésre álló információk értékelésre javasolt elvégezni az adatok bizonyító erejének elemzését annak érdekében, hogy meg lehessen határozni, hogy az *in vivo* szemvizsgálatokon kívül szükség van-e egyéb vizsgálatokra az irritáló/korróziós potenciál jellemzéséhez. Ha további vizsgálatokra van szükség, a vonatkozó kísérleti adatok összegyűjtéséhez a lépcsőzetes vizsgálati stratégiát javasolt alkalmazni. Az olyan anyagok esetében, amelyeket korábban nem vizsgáltak, az anyag szemkorróziós/szemirritációs potenciáljának értékeléséhez szükséges adatsor előállításához a lépcsőzetes vizsgálati stratégiát kell alkalmazni. Az ebben a mellékletben ismertetett vizsgálati stratégiát egy OECD-munkaértekezleten (1) dolgozták ki, majd később jóváhagyták, és a Harmonizált integrált veszélyosztályozási rendszer a vegyi anyagok humán egészségügyi és környezeti hatásainak osztályozására keretében kibővítették és 1998 novemberében a Vegyi Anyag Bizottság és a Vegyi Anyag Munkacsoport 28. együttes ülésén jóváhagyták (2).

Bár ez a vizsgálati stratégia nem képezi szerves részét a B.5. vizsgálati módszernek, kifejezésre juttatja a szemirritációs/szemkorróziós sajátosságok meghatározására ajánlott megközelítést. Ez a megközelítés testesíti meg a legjobb gyakorlatot, és etikai szempontból is irányadó az *in vivo* szemirritációs/szemkorróziós vizsgálatokhoz. A vizsgálati módszer útmutatást ad az *in vivo* vizsgálatok elvégzéséhez és összefoglalja azokat a tényezőket, amelyeket az ilyen vizsgálatok megkezdése előtt fontolóra kell venni. A lépcsőzetes vizsgálati stratégia az adatok bizonyító erején alapuló megközelítést tesz lehetővé az anyagok szemirritációs/szemkorróziós tulajdonságaival kapcsolatos meglévő adatok értékeléséhez, és lépcsőzetes megközelítést azon anyagok vonatkozó adatainak összegyűjtéséhez, amelyekhez további vizsgálatokra van szükség, vagy amelyeket korábban egyáltalán nem vizsgáltak. A stratégia magában foglalja továbbá, hogy először validált és elfogadott *in vitro* vagy *ex vivo* vizsgálatokat kell végezni, majd meghatározott körülmények esetén a B.4. bőrirritációs/bőrkorróziós vizsgálati módszerrel további vizsgálatokat (3) (4) kell lefolytatni.

A LÉPÉSENKÉNTI VIZSGÁLATI STRATÉGIA ISMERTETÉSE

A vizsgálatoknak a lépcsőzetes vizsgálati stratégia (ábra) keretében történő elvégzése előtt minden rendelkezésre álló információt ki kell értékelni annak meghatározása érdekében, hogy szükség van-e *in vivo* szemvizsgálatokra. Bár egy-egy paraméter (pl. szélsőséges pH-érték) vizsgálatából is jelentős mennyiségű információ nyerhető ki, az összes rendelkezésre álló információt figyelembe kell venni. A kérdéses anyag vagy szerkezeti analógjai hatásaival kapcsolatos összes vonatkozó adatot értékelni kell az adatok bizonyító erejéről való döntés meghozatalakor, és meg is kell indokolni ezt a döntést. Elsődleges hangsúlyt kell fektetni az anyaggal kapcsolatban rendelkezésre álló humán és állatkísérletes adatokra, ezt követően az *in vitro* vagy *ex vivo* vizsgálatok eredményére. Lehetőség szerint kerülni kell korróziós hatású anyagok *in vivo* vizsgálatát. A vizsgálati stratégia során figyelembe veendő tényezők a következők:

A rendelkezésre álló humán és állatkísérletes adatok értékelése (1. lépés). Első lépésben a rendelkezésre álló humán adatokat, pl. klinikai vagy munkaegészségügyi vizsgálatokat, valamint esettanulmányokat és/vagy állatokban végzett szemvizsgálatok adatait kell kiértékelni, mivel ezek a szemre gyakorolt hatásokkal közvetlenül összefüggő információkat szolgáltatnak. Ezt követően a rendelkezésre álló bőrkorróziós/bőrirritációs humán vizsgálatok és/vagy állatkísérletes adatait kell kiértékelni. Az ismerten szemkorróziós hatású vagy súlyosan szemirritáló anyagokat nem szabad állatok szemébe cseppenteni, ahogyan a bőrre korróziós hatású vagy irritáló anyagokat sem; az ilyen anyagokat úgy kell tekinteni, hogy a szemre is korróziós hatásúak és/vagy irritálók. Nem szabad *in vivo* szemvizsgálatokat végezni olyan anyagokkal sem, amelyek esetében korábbi szemvizsgálatok alapján elegendő bizonyíték van az ilyen hatások hiányára.

A szerkezet-aktivitási összefüggések (SAR) elemzése (2. lépés). Ha vannak, fontolóra kell venni szerkezetileg rokon anyagok vizsgálatát. Ha a szerkezetileg rokon anyagokkal vagy elegyeikkel kapcsolatban elegendő olyan humán és/vagy állatkísérletes adat áll rendelkezésre, amely valószínűsíti a szemkorróziós/szemirritációs potenciált, feltételezhető, hogy a vizsgálandó anyag ugyanilyen válaszreakciókat vált ki. Ilyen esetekben a vizsgálandó anyagot esetleg nem kell megvizsgálni. A lépcsőzetes vizsgálati stratégia értelmében a szerkezetileg rokon anyagok vagy elegyeik vizsgálatából származó negatív adatok nem jelentenek elegendő bizonyítékot arra, hogy az anyag nem korróziós hatású vagy nem irritáló. A bőrre és a szemre gyakorolt hatások vonatkozásában is validált és elfogadott SAR-megközelítéseket kell alkalmazni a korróziós és irritáló potenciál meghatározására.

Fizikai-kémiai tulajdonságok és kémiai reaktivitás (3. lépés). A szélsőséges, például a pH 2,0 és 11,5 kémhatású anyagok erőteljes lokális hatást gyakorolhatnak. Ha a szélsőséges pH-érték az alapja annak, hogy egy anyagot korróziós hatásúnak minősítsenek, akkor figyelembe lehet venni az anyag sav/alkáli tartalékát (vagy pufferkapacitását) is (5) (6). Ha a pufferkapacitás alapján valószínűsíthető, hogy az anyag nem szemkorróziós hatású, akkor ennek megerősítésére további vizsgálatokat kell végezni, lehetőleg validált és elfogadott *in vitro* vagy *ex vivo* módszerek alkalmazásával (lásd az 5. és 6. lépést).

Más meglévő információk fontolóra vétele (4. lépés). Ebben a fázisban a dermális alkalmazás esetén jelentkező szisztémás toxicitással kapcsolatban rendelkezésre álló összes információt ki kell értékelni. A vizsgálandó anyag akut dermális toxicitását is fontolóra kell venni. Előfordulhat, hogy nem kell a szemben megvizsgálni egy anyagot, ha igazolták, hogy dermális alkalmazás esetén erősen mérgező. Bár nem feltétlenül van összefüggés az akut dermális toxicitás és a szemirritáció/szemkorrózió között, fel kell tételezni, hogy ha egy szer dermálisan alkalmazva erősen mérgező, a szembe cseppentve is nagyon mérgező lesz. Az ilyen adatokat a 2. és a 3. lépés között is figyelembe lehet venni.

In vitro vagy ex vivo vizsgálatok eredményei (5. és 6. lépés). Nem kell állatokon kísérletezni olyan anyagokkal, amelyek validált és kimondottan a szem vagy a bőr korróziójának/irritációjának értékelésére elfogadott módszerekkel végzett *in vitro* vagy *ex vivo* vizsgálatokban (7) (8) korróziós vagy súlyos irritáló hatást mutattak. Ilyen esetben fel lehet tételezni, hogy az anyag *in vivo* is hasonlóan súlyos hatásokat vált ki. Ha nem állnak rendelkezésre validált és elfogadott *in vitro* *ex vivo* vizsgálatok, át lehet ugorni az 5. és a 6. lépést és közvetlenül a 7. lépéshez lépni.

Az anyag in vivo bőrirritáló vagy bőrkorróziós hatásának vizsgálata (7. lépés). Ha a fent felsorolt vizsgálatok adatai alapján nincs elegendő bizonyíték, amellyel meggyőző módon el lehetne végezni az anyag szemirritációs/szemkorróziós potenciáljának az adatok bizonyító erején alapuló elemzését, először az *in vivo* bőrirritációs/bőrkorróziós potenciált kell a B4. vizsgálati módszer (4) és az ahhoz csatolt melléklet (9) segítségével kiértékelni. Ha kimutatható, hogy az anyag bőrkorróziót vagy súlyos bőrirritációt okoz, más következtetést alátámasztó információk hiányában az anyagot korróziós hatású szemirritáló anyagnak kell tekinteni. Ilyen módon tehát nem kell *in vivo* szemvizsgálatot végezni. Ha az anyag nem bőrkorróziós vagy súlyosan bőrirritáló hatású, *in vivo* szemvizsgálatot kell végezni.

In vivo vizsgálat nyulakban (8. és 9. lépés). Az *in vivo* szemvizsgálatokat egyetlen állatot alkalmazó kiindulási vizsgálattal kell kezdeni. Ha ennek eredményei szerint az anyag súlyosan szemirritáló vagy szemkorróziós hatású, nem szabad további vizsgálatokat végezni. Ha a kiindulási vizsgálat nem mutat ki semmilyen korróziós vagy súlyosan irritáló hatást, két további állat alkalmazásával ellenőrző vizsgálatot kell végezni.

HIVATKOZÁSOK

(1) OECD (1996) OECD Test Guidelines Programme: Final Report of the OECD Workshop on Harmonization of Validation and Acceptance Criteria for Alternative Toxicological Test Methods. Held in Solna, Sweden, 22–24 January 1996 (<http://www1.oecd.org/ehs/test/background.htm>).

(2) OECD (1998) Harmonized Integrated Hazard Classification System for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances, as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals, November 1998 (<http://www1.oecd.org/ehs/Class/HCL6.htm>).

(3) Worth, A.P. and Fentem J.H. (1999). A General Approach for Evaluating Stepwise Testing Strategies. ATLA 27, 161–177.

(4) B4. vizsgálati módszer, Akut toxicitás: bőrirritáció/korrózió.

(5) Young, J.R., How, M.J., Walker, A.P., Worth W.M.H. (1988) Classification as Corrosive or Irritant to Skin of Preparations Containing Acidic or Alkaline Substance Without Testing on Animals. *In Vitro*, 2, 19–26.

(6) Neun, D.J. (1993) Effects of Alkalinity on the Eye Irritation Potential of Solutions Prepared at a Single pH. J. Toxicol. Cut. Ocular Toxicol. 12, 227–231.

(7) Fentem, J.H., Archer, G.E.B., Balls, M., Botham, P.A., Curren, R.D., Earl, L.K., Edsail, D.J., Holzhtter, H.G. and Liebsch, M. (1998) The ECVAM international validation study on in vitro tests for skin corrosivity. 2. Results and evaluation by the Management Team. Toxicology in Vitro 12, pp. 483–524.

(8) B40. vizsgálati módszer, Bőrkorróziós hatás.

(9) A B4. vizsgálati módszer melléklete: Lépcsőzetes vizsgálati stratégia bőrirritációhoz és bőrkorrózióhoz.

Ábra

Vonatkozó vizsgálati és kiértékelési stratégia szemirritáció, illetve szemkorróziós hatás vizsgálatához

Tevékenység	Eredmény	Következtetés
1. A meglévő humán és/vagy állatkísérletes adatok szerint hatással van a szemre	Súlyos szemkárosodás	Csúcs végpont; szemkorróziós hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra.
	Szemirritáló hatású	Csúcs végpont; szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra.
	Nem korróziós hatású vagy irritáló a szemre	Csúcs végpont; nem szemkorróziós és nem szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség vizsgálatokra.
A meglévő humán és/vagy állatkísérletes adatok szerint bőrkorróziós hatású	Bőrkorróziós hatású	Fel kell tételezni, hogy szemkorróziós hatású. Nincs szükség vizsgálatokra.
A meglévő humán és/vagy állatkísérletes adatok szerint súlyosan bőrirritáló	Súlyosan bőrirritáló	Fel kell tételezni, hogy szemirritáló hatású. Nincs szükség vizsgálatokra.

Nincs információ, vagy van, de nem meggyőző

2. SAR-értékelést kell végezni a szemkorrózióra/szemirritációra vonatkozóan	Súlyos szemkárosodást jelez előre	Fel kell tételezni, hogy szemkorróziós hatású. Nincs szükség vizsgálatokra.
	Szemirritációt jelez előre	Fel kell tételezni, hogy szemirritáló hatású. Nincs szükség vizsgálatokra.
SAR-értékelést kell végezni a bőrkorrózióra vonatkozóan	Bőrkorróziót jelez előre	Fel kell tételezni, hogy szemkorróziós hatású. Nincs szükség vizsgálatokra.

Nem lehet előrejelzést tenni, vagy az előrejelzések nem meggyőzők vagy negatívak

3. Meg kell mérni a pH-t (adott esetben figyelembe kell venni a pufferkapacitást is)	pH 2 vagy 11,5 (nagy pufferkapacitással, amennyiben lényeges)	Fel kell tételezni, hogy szemkorróziós hatású. Nincs szükség vizsgálatokra.
--	---	---

2 < pH < 11,5, vagy pH 2 vagy pH 11,5 alacsony vagy nulla pufferkapacitással, amennyiben lényeges

Tevékenység	Eredmény	Következtetés
4. Ki kell értékelni a dermális alkalmazás esetén mérhető szisztémás toxicitást	Nagyon mérgező olyan koncentrációknál, ahol a szemvizsgálatokat végeznék.	Az anyag túlzottan mérgező ahhoz, hogy vizsgálni lehessen. Nincs szükség vizsgálatokra.
<i>Nincs ilyen információ, vagy az anyag nem nagyon mérgező</i>		
5. El kell végezni egy validált <i>in vitro</i> vagy <i>ex vivo</i> szemkorróziós vizsgálatot	Korróziós hatásra utaló válasz	<i>In vivo</i> korróziós hatást kell feltételezni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
<i>Az anyag nem korróziós hatású, vagy a szemkorróziós vizsgálatára még nincsenek validált <i>in vitro</i> vagy <i>ex vivo</i> vizsgálati módszerek</i>		
6. El kell végezni egy validált és elfogadott <i>in vitro</i> vagy <i>ex vivo</i> szemirritációs vizsgálatot	Irritáló válasz	Fel kell feltételezni, hogy szemirritáló hatású. Nincs szükség további vizsgálatokra.
<i>Az anyag nem irritáló, vagy a szemirritáció vizsgálatára vonatkozóan még nincsenek validált <i>in vitro</i> vagy <i>ex vivo</i> vizsgálati módszerek</i>		
7. Kísérleti úton meg kell határozni az <i>in vivo</i> szemirritációs/szemmarási potenciált (l. a 4B. vizsgálati módszert és annak mellékletét)	Korróziós hatás vagy súlyos irritációs válasz	Fel kell tételezni, hogy szemkorróziós hatású. Nincs szükség további vizsgálatokra.
<i>Az anyag nem korróziós hatású vagy nem súlyosan szemirritáló</i>		
8. Egyetlen nyúlra el kell végezni az előzetes <i>in vivo</i> szemvizsgálatot	Súlyos szemkárosodás	Szemkorróziós hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
<i>Nincs súlyos károsodás, vagy nincs válasz</i>		
9. Egy vagy két további állaton el kell végezni az ellenőrző vizsgálatot	Korróziós vagy irritáló hatású	Szemkorróziós vagy szemirritáló hatásúnak kell tekinteni. Nincs szükség további vizsgálatokra.
	Nem korróziós vagy irritáló hatású	Nem szemkorróziós és nem szemirritáló hatású. Nincs szükség további vizsgálatokra.

6. számú melléklet az 56/2005. (XI. 29.) EüM–KvVM–BM együttes rendelethez**B.31. PRENATÁLIS FEJLŐDÉSI TOXICITÁS VIZSGÁLAT****1. MÓDSZER**

Ez a módszer az OECD TG 414 (2001) módszer megfelelője.

1.1. Bevezetés

E fejlődési toxicitási vizsgálati módszer segítségével általános információk nyerhetők a vemhes kísérleti állatot és a méhben fejlődő élő szervezetet érő prenatális expozíció hatásaival kapcsolatosan, és magában foglalhatja az anyai hatások, továbbá a magzatelhalás, a magzatban fellépő strukturális rendellenességek vagy rendellenes növekedés vizsgálatát. A funkcionális defektusok, bár a fejlődés szempontjából igen fontosak, nem képezik szerves részét ennek a módszernek. Az ilyen hatások külön vizsgálat vagy e módszerhez kapcsolódóan kiegészítő vizsgálat keretében tanulmányozhatók a fejlődési neurotoxicitási vizsgálati módszer alkalmazásával. A funkcionális defektusok és más posztnatális hatások vizsgálatára vonatkozó információkkal kapcsolatban a kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálati módszert, valamint a fejlődési neurotoxicitási vizsgálati módszert kell segítségül hívni adott esetben.

E vizsgálati módszert esetenként a vizsgálandó anyaggal, így például annak fizikai-kémiai vagy toxikológiai tulajdonságaival kapcsolatos konkrét ismeretek alapján egyedi esetekhez kell adaptálni. Az ilyen adaptáció akkor elfogadható, ha meggyőző tudományos bizonyítékok szerint informatívabb vizsgálatot eredményez. Ilyen esetben a tudományos bizonyítékokat részletesen ismertetni kell a vizsgálati jelentésben.

1.2. Fogalommeghatározások

»*Fejlődési toxikológia*«: a fogantatás előtt vagy a prenatális fejlődés során, vagy a születés és szexuális érés közötti időszakban (posztnatálisan) történő expozícióból származó, a fejlődő élő szervezetet érő káros hatások vizsgálata. A fejlődési toxicitás fő megnyilvánulásai: 1. az élő szervezet elhalása/elhullása, 2. strukturális rendellenesség, 3. rendellenes növekedés és 4. funkcionális defektus. A fejlődési toxikológia korábban teratológia néven volt ismert.

»*Káros hatás*«: a normálhoz képest bármilyen, a kezeléssel összefüggő elváltozás, amely csökkenti az élő szervezet túlélésre, szaporodásra vagy környezethez való alkalmazkodásra való képességét. A fejlődési toxikológia területén a legszélesebb értelemben véve ide tartozik bármely olyan hatás, amely megzavarja a konceptus normális fejlődését a születés előtt és után.

»*Rendellenes növekedés*«: az utód szerveinek vagy testének tömegében vagy méretében bekövetkező elváltozás.

»*Elváltozások (rendellenességek)*«: strukturális elváltozások a fejlődés során, amelyek magukban foglalják mind a deformitásokat, mind az eltéréseket (28).

»*Deformitás/súlyos fejlődési rendellenesség*«: az állatra ártalmasnak (vagy akár letálisnak) tartott strukturális változás, amely általában ritka.

»*Eltérés/kiseb fejlődési rendellenesség*«: az állatra kismértékben ártalmasnak vagy ártalmatlannak tartott strukturális változás; lehet átmeneti jellegű, és viszonylag gyakran előfordulhat a kontrollpopulációban.

»*Konceptus*«: a megtermékenyített petesejt származékainak összessége a fejlődés bármely szakaszában a megtermékenyítéstől a születésig, amely magában foglalja az extraembrionális burkokat és az embriót vagy magzatot is.

»*Beágyazódás*«: a blasztocisztának a méh hámrétegéhez való kapcsolódása, amely magában foglalja a méh hámszövetén történő áthatolást és méhnyálkahártyába történő beágyazódását.

»*Embrió*«: az élő szervezet korai vagy fejlődő stádiuma, mégpedig a megtermékenyített petesejtből kialakuló fejlődési produktum a hosszanti tengely megjelenése után, és amíg és az összes főbb struktúra ki nem alakul.

»*Embriotoxicitás*«: ártalmas hatás az embrió normál struktúrájára, fejlődésére, növekedésére és/vagy életképességére.

»*Magzat*«: a posztembrionális szakaszban lévő, meg nem született utód.

»*Magzati toxicitás*«: ártalmas hatás a magzat normál struktúrájára, fejlődésére, növekedésére és/vagy életképességére.

»*Abortusz*«: a fogantatás produktumának, azaz az embriónak vagy egy életképtelen magzatnak a méhből történő idő előtti kilökődése/eltávolítása.

»*Felszívódás*«: a méhbe beágyazódott, majd elhalt konceptus felszívódik vagy felszívódott.

»*Korai felszívódás*«: a beágyazódás nyoma felismerhető embrió/magzat nélkül.

»*Késői felszívódás*«: elhalt embrió vagy magzat külső degeneratív változásokkal.

»NOAEL«: a nem észlelhető káros hatás szintjének (no-observed-adverse-effect-level) rövidítése, amely azt a legmagasabb dózisszintet vagy expozíciós szintet jelöli, amelynél nem figyelhetők meg a kezeléssel összefüggő káros hatások.

1.3. Referenciaanyag

Nincs.

1.4. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálandó anyagot általában vemhes állatoknak adagolják legalább a beágyazódástól az exterminalás tervezett időpontját megelőző napig, amelynek a lehető legközelebb kell esnie az ellés normál napjához anélkül, hogy az idő előtti ellés miatt felmerülne az adatok elvesztésének kockázata. A vizsgálati módszerrel nemcsak az organogenezis időszakát (pl. rágszálókban az 5. és 15. nap közötti időszak, nyúlban pedig a 6. és 18. nap közötti időszak) lehet vizsgálni, hanem már a beágyazódás előtti időszaktól kezdve adott esetben az egész vemhességen át a császármetszés előtti napig jelentkező hatásokat is. Röviddel a császármetszés előtt a nőtényeket exterminalni kell, és meg kell vizsgálni a méhtartalmat, a magzatok esetében pedig meg kell vizsgálni a külsőleg látható rendellenességeket, valamint a lágyyszövetben és vázrendszerben észlelhető elváltozásokat.

1.5. A vizsgálati módszer ismertetése

1.5.1. Az állatfaj kiválasztása

Ajánlatos a vizsgálatot az erre legalkalmasabb fajban végezni, és olyan laboratóriumi fajt és törzset alkalmazni, amelyet széles körben használnak prenatális fejlődési toxicitási vizsgálatokhoz. A preferált rágszálófaj a patkány, a preferált nem rágszálófaj pedig a nyúl. Az ettől eltérő fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell.

1.5.2. Az állatok tartásának és etetésének körülményei

Rágszálók esetében a kísérleti helyiség hőmérsékletének $22\text{ °C} (\pm 3\text{ °C})$ -nak, nyulak esetében pedig $18\text{ °C} (\pm 3\text{ °C})$ -nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30%-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70%-ot, a célértéknek 50 és 60% között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

A pároztatásokat erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. Bár előnyösebb a pároztatott állatokat egyedileg tartani, kis számban csoportos tartás is elfogadható.

1.5.3. Az állatok előkészítése

Legalább 5 napon át a laboratórium körülményeihez szoktatott, egészséges állatokat kell alkalmazni, amelyek korábban nem voltak más kísérlet alanyai. A kísérleti állatok jellemzésekor meg kell adni az állat fajtát, törzsét, származását, ivarát, testtömegét és/vagy életkorát. Amennyire csak megoldható, az állatok az összes vizsgálati csoportban legyenek azonos testtömegűek és korúak. Minden dózishoz még egyszer sem ellett, fiatal felnőtt nőtényeket kell használni. A nőtényeket azonos fajú és azonos törzsből származó hímekkel kell pároztatni, és kerülni kell a testvérek pároztatását. Rágszálók esetében a vemhesség 0. napja az, amikor hüvelydugó és/vagy sperma észlelhető; nyulak esetében a 0. nap általában a párzás vagy a mesterséges megtermékenyítés napja, ha ezt a technikát alkalmazzák. A pároztatott nőtényeket torzítatlan módon kell a kontroll- és a kezelési csoportokba beosztani. A ketrecek úgy kell elrendezni, hogy minimálisan lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezése jelentette lehetséges hatásokat. Minden állatot egyedi azonosítószámmal kell ellátni. A pároztatott nőtényeket torzítatlan módon kell beosztani a kontroll- és a kezelési csoportokba, és ha a nőtényeket csoportosan pároztatják, az egyes pároztatási csoportokból származó állatokat egyenletesen kell elosztani a kezelési és kontrollcsoportokba. Az azonos hímmel pároztatott nőtényeket is egyenletesen kell szétosztani a különböző csoportokba.

1.6. Eljárás

1.6.1. Az állatok száma és ivara

Minden vizsgálati és kontrollcsoportba elegendő számú nőtényt kell beosztani ahhoz, hogy legalább körülbelül 20 olyan nőtény álljon rendelkezésre, amelyekben a boncoláskor beágyazódási helyek találhatók. A 16-nál kevesebb nőtényt – amelyekben beágyazódási helyek találhatók – tartalmazó csoportok esetleg nem megfelelőek a vizsgálatra. Az anyaállatok elhullása nem feltétlenül teszi érvénytelenné a vizsgálatot, feltéve, hogy arány nem haladja meg a körülbelül 10%-ot.

1.6.2. A dózisok előkészítése

Ha a beadás megkönnyítése érdekében vivőanyagot vagy más adalékot alkalmaznak, a következő jellemzőket kell figyelembe venni: a vizsgálandó anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára és visszatartására vagy kiürülésére gyakorolt hatások; a vizsgálandó anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatások, amelyek megváltoztathatják annak

toxikus jellemzőit; valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások. A vivőanyag nem lehet fejlődésre toxikus és nem lehet hatással a szaporodásra sem.

1.6.3. Adagolás

A vizsgálendő anyagot általában naponta kell beadni, a beágyazódástól (pl. a pároztatás utáni 5. naptól) a császármetszés tervezett időpontja előtti napig. Ha az esetlegesen végzett előzetes vizsgálatok szerint nincs nagy valószínűsége a beágyazódás előtti veszteségnek, a kezelést az egész vemhességi időszakra ki lehet terjeszteni, azaz a pároztatástól egészen az exterminálás tervezett időpontja előtti napig. Jól ismert, hogy a vemhesség során a nem megfelelő bánásmód vagy stressz prenatális veszteséghez vezethet. A kezeléssel nem összefüggő tényezők miatti prenatális veszteség kivédése érdekében kerülni kell a vemhes állatok szükségtelen kezelését, valamint a külső tényezők, így például zaj miatti stresszt.

Legalább három dózisszintet és ezzel párhuzamos kontrollt kell alkalmazni. A kezelési és kontrollcsoportokba egészséges állatokat kell torzítatlan módon beosztani. A dózisszinteket úgy kell megválasztani, hogy biztosítsák a kiváltott toxikus hatások fokozatosságát. Hacsak a vizsgálendő anyag fizikai/kémiai jellege vagy biológiai tulajdonságai nem szabnak ennek határt, a legmagasabb dózist úgy kell megválasztani, hogy valamilyen mértékű fejlődési és/vagy anyai toxicitást (klinikai tünetek vagy testtömeg-csökkenés) idézzon elő, de ne okozzon elhullást vagy súlyos szenvedést. A legalább egy köztes dózist úgy kell megválasztani, hogy minimális mértékű észlelhető toxikus hatást váltson ki. Végül a legalacsonyabb dózist úgy kell megválasztani, hogy semmilyen anyai vagy fejlődési toxicitásra utaló tünetet ne okozzon. A dózisok csökkenő sorrendjét úgy kell megválasztani, hogy demonstrálhassák az esetleges dózisfüggő válaszokat és a nem észlelhető káros hatás szintjét (NOAEL). A csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása és nagyon nagy intervallumok (pl. 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazása esetén gyakran előnyös a dózisok közé egy negyedik vizsgálati csoportot is beiktatni. Bár a cél az anyai NOAEL meghatározása, olyan vizsgálatok is elfogadhatók, amelyben nem határozzák meg ezt (1).

A dózisszintek megválasztásakor figyelembe kell venni mind az esetleg rendelkezésre álló toxicitási adatokat, mind a vizsgálendő anyag vagy rokon anyagok metabolizmusával vagy toxikokinetikájával kapcsolatos további információkat. Ezek az információk segítik majd az adagolási rend megfelelő voltának igazolását is.

Szükség van egy párhuzamos kontrollcsoportra is. Ez a csoport egy placebóval kezelt kontrollcsoport, vagy ha a vizsgálendő anyag beadásához vivőanyagot használnak, akkor egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport. Minden csoportban ugyanolyan térfogatú vizsgálendő anyagot vagy vivőanyagot kell beadni. A kontrollcsoport(ok)ba tartozó állatokat ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. A vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokban a legnagyobb alkalmazott mennyiségben kell beadni a vivőanyagot (ahogyan a legalacsonyabb dózisú kezelési csoportban).

1.6.4. Határérték-vizsgálat

Ha egy egyetlen, legalább 1000 mg/testtömeg-kg/nap orális dózist alkalmazásával történő és az itt ismertetett eljárások szerint elvégzett vizsgálat sem a vemhes állatokban, sem utódaikban nem idéz elő észlelhető toxicitást, és ha egy hatás a rendelkezésre álló adatok (pl. szerkezetileg és/vagy metabolizmus szempontjából rokon vegyületekkel kapcsolatos adatok) alapján nem várható, a három dózisszint alkalmazásával történő teljes vizsgálatot esetenként szükségtelen elvégezni. A várható humán expozíció magasabb orális dózis alkalmazását teszi esetleg szükségessé a határérték-vizsgálat során. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálendő anyag fizikai-kémiai tulajdonságai gyakran előre jelezhetik, illetve behatárolhatják a lehetséges expozíciós szint maximumát (például a dermális alkalmazás nem okozhat súlyos lokális toxicitást).

1.6.5. A dózisok beadása

A vizsgálendő anyagot vagy vivőanyagot általában orálisan, intubálással adagolják. Ha más beadási módot alkalmaznak, a vizsgálatot végzőnek ezt részletesen indokolnia kell, és szükség lehet ennek megfelelő módosításokra is (2) (3) (4). A vizsgálendő anyagot mindennap körülbelül ugyanabban az időpontban kell beadni.

Az egyes állatoknak beadandó dózist általában a legutóbbi testtömeg-mérés eredménye alapján kell meghatározni. A vemhesség utolsó trimeszterében azonban óvatosan kell eljárni a dózis beállításakor. A túlzott anyai toxicitás megelőzése érdekében a dózisok megválasztásához fel kell használni a meglévő adatokat. Ha azonban túlzott toxicitást észlelnek a kezelt anyaállatokban, humánus módon exterminálni kell őket. Ha több vemhes állatban is a túlzott toxicitás jelei észlelhetők, meg kell fontolni az adott dóziscsoport kezelésének leállítását. Ha az anyagot mesterséges táplálással adagoljuk, a dózist lehetőleg egyszerre kell egy gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni az állatnak. Az, hogy egyszerre maximálisan mekkora térfogatú folyadékot lehet beadni, az állat méretétől függ. A térfogat nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömeg-arányt, kivéve vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100 g testtömeg-arány is alkalmazható. Ha vivőanyagként kukoricacsíra-olajat alkalmaznak, az egyszerre beadott térfogat nem lehet több mint

0,4 ml/100 g testtömeg. A koncentrációk megfelelő beállításával minimalizálni kell a beadott térfogat variabilitását, és így kell biztosítani, hogy minden dózisszintnél azonos legyen a térfogat.

1.6.6. Az anyaállatok megfigyelése

Legalább naponta egyszer el kell végezni, és le kell jegyezni a klinikai megfigyeléseket, mégpedig lehetőleg mindig ugyanabban az időpontban vagy időpontokban, amihez figyelembe kell venni azt is, hogy a beadás után várt hatások mikor érik el a maximumukat. Rögzíteni kell az állatok állapotát, ezen belül elhullását, elhullás közelében lévő állapotát, lényeges viselkedésbeli változásait, illetve a szemmel látható toxicitás minden jelét.

1.6.7. Testtömeg és táplálékfogyasztás

A vemhesség 0. napján, vagy ha külső forrásból beszerzett, adott időben pároztatott állatokat alkalmaznak, akkor legkésőbb a vemhesség 3. napján, majd a kezelés első napján és azt követően a kezelési időszakban legalább 3 naponta, továbbá az exterminálás tervezett napján meg kell mérni az állatok testtömegét.

A táplálékfogyasztást háromnaponta kell feljegyezni, ezen belül is ugyanazon a napon, amikor a testtömeg-méréseket végzik.

1.6.8. Post mortem vizsgálat

A nőtényeket az ellés várható időpontját megelőző napon kell exterminálni. Az exterminálás tervezett időpontja előtt abortusz vagy koraellés jeleit mutató nőtényeket exterminálni kell, majd a tetemeket alapos makroszkópos vizsgálatnak kell alávetni.

A vizsgálat befejezésekor vagy a vizsgálat során bekövetkező elhullás során makroszkóposan meg kell vizsgálni az anyaállatban az esetleges strukturális rendellenességeket vagy patológiás elváltozásokat. A torzítások minimalizálása érdekében a császármetszés során az anyaállatok, majd ezt követően a magzatok vizsgálatát lehetőleg anélkül kell végezni, hogy tudható lenne, melyik kezelési vagy kontrollcsoportból származnak.

1.6.9. A méhtartalom vizsgálata

A vizsgálat befejezésekor vagy az elhullás után amilyen gyorsan csak lehet, ki kell venni az állatok méhét, és ellenőrizni kell, hogy vemhesek voltak-e. Azokat a méheket, amelyek nem tűnnek vemhesnek, további vizsgálatoknak (pl. rágcslók esetében ammónium-szulfid festésnek, nyulak esetében pedig Salewski-festésnek vagy más megfelelő eljárásnak) kell alávetni annak igazolása érdekében, hogy az állat valóban nem volt vemhes (5).

A vemhes méheket a méhnyakkal együtt meg kell mérni. Nem kell megmérni azoknak a vemhes méheknek a tömegét, amelyeket a vizsgálat során elhullott állatokból vettek ki.

A vemhes állatokban meg kell határozni a sárgatestek számát is.

A méhtartalom vizsgálatakor meg kell határozni, hogy hány embrió vagy magzat halt el, illetve hogy hány életképes magzatot tartalmaz. Le kell írni a felszívódás mértékét, hogy megbecsülhető legyen a konceptus elhalásának relatív időpontja (lásd: 1.2. szakasz).

1.6.10. A magzatok vizsgálata

Minden magzat esetében meg kell határozni a magzat ivarát és testtömegét.

Minden magzat esetében meg kell továbbá vizsgálni, hogy vannak-e külső elváltozások (6).

A magzatokban meg kell vizsgálni, hogy vannak-e vázrendszeri és lágyyszöveti elváltozások (pl. eltérések és deformitások vagy rendellenességek) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24). Előnyös, de nem feltétlenül szükséges a magzati elváltozások kategorizálása. Ha elvégezzük a kategorizálást, világosan meg kell jelölni az egyes kategóriák meghatározásának kritériumait. Különös figyelmet kell szentelni a szaporítószervek vizsgálatának, és ezen belül a rendellenes fejlődés jeleinek.

Rágcslók esetében körülbelül az alom felét kell előkészíteni a vázrendszeri, a maradékot pedig a lágyyszöveti elváltozások vizsgálatára, ahol az utóbbihoz elfogadott és megfelelő sorozatmetszési módszereket vagy óvatos makroszkópos boncolási technikákat kell alkalmazni.

Nem rágcslók, pl. nyulak esetében, minden magzatban meg kell vizsgálni mind a lágyyszöveti, mind pedig a vázrendszeri elváltozásokat. A lágyyszöveti elváltozások vizsgálatához a magzatok testét óvatos boncolás segítségével kell értékelni, amely magában foglalhatja a belső szívstruktúra további tanulmányozását is (25). Az így megvizsgált magzatok felénél el kell távolítani a fejet, és elő kell készíteni az abban lévő lágyyszövetek (szem, agy, orrjáratok és nyelv) vizsgálatára, amelyhez standard sorozatmetszési módszereket (26) vagy más, ugyanilyen érzékeny módszert kell alkalmazni. A testeket, illetve a fennmaradó ép magzatok testét elő kell készíteni a vázrendszeri elváltozások vizsgálatára, amelyhez ugyanazokat a módszereket kell használni, mint rágcslók esetében.

2. ADATOK

2.1. Az eredmények kezelése

Az adatokat mind az anyaállatok, mind utódaik esetében egyedileg kell a jelentésben rögzíteni, majd táblázatos formában is össze kell foglalni, amelyben minden egyes vizsgálati csoport és generáció esetében fel kell tüntetni az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okok miatt exterminált állatok számát, valamint az elhullások és a humánus exterminációk időpontját, a vemhes nőstények számát, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ezen belül bármely toxikus tünet megjelenésének időpontját, valamint ezek időtartamát és súlyosságát, az embriókkal/magzatokkal kapcsolatos megfigyeléseket és az almokra vonatkozó minden vonatkozó adatot.

A számszerű eredményeket megfelelő statisztikai módszerrel kell kiértékelni, amelynél az adatanalízishez használt egység az alom. Általánosan elfogadott statisztikai módszert kell használni; a vizsgálat megtervezése során kell azt kiválasztani, és a választást meg kell indokolni. A jelentésben fel kell tüntetni azoknak az állatoknak az adatait is, amelyek nem maradtak életben a tervezett exterminálásuk időpontjáig. Adott esetben a csoportátlagok számításához is fel lehet használni ezeket az adatokat. Az ilyen állatokból nyert adatok alkalmazhatóságát, és így a csoportátlag(ok)ba való beszámításukat vagy abból való kizárásukat minden esetben egyedileg kell meghatározni, és megfelelően indokolni is kell.

2.2. Az eredmények értékelése

A prenatális fejlődési toxicitási vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások szempontjából kell értékelni. Az értékelés az alábbi információkat foglalja magában:

- az anyaállatok és az embriók/magzatok vizsgálatainak eredményei, ezen belül az állat expozíciója és az egyes hatások gyakorisága vagy súlyossága közötti összefüggések vagy azok hiányának értékelése;
- a magzatok külső, légyszöveti és vázrendszeri elváltozásainak esetleges kategorizálásánál alkalmazott kritériumok;
- a vizsgálat eredményeinek értelmezését javítandó, adott esetben korábbi kontrolladatok;
- az összes százalék és mérőszám számításához felhasznált számadatok;
- adott esetben a vizsgálat eredményeinek megfelelő statisztikai elemzése, amelynek elegendő információt kell tartalmaznia az elemzési módszerrel kapcsolatban ahhoz, hogy egy független bíráló vagy statisztikus újra tudja értékelni vagy rekonstruálni tudja az elemzést;

Bármely olyan vizsgálatban, amely a toxikus hatások hiányát igazolja, további vizsgálatokat kell végezni a vizsgálandó anyag felszívódásának és biológiai hozzáférhetőségének meghatározására.

2.3. Az eredmények értelmezése

A prenatális fejlődési toxicitási vizsgálatokkal a vemhesség során egy anyaggal történő ismételt expozíciónak az anyaállatra és utódai méhen belüli fejlődésére gyakorolt hatásai tanulmányozhatóak. A vizsgálat eredményeit a szubkrónikus, reprodukciós, toxikokinetikai és egyéb vizsgálatok eredményeivel összefüggésben kell értelmezni. Mivel mind az általános toxicitásra (az anyai toxicitás révén), mind pedig a fejlődési toxicitási végpontokra hangsúly kerül, a vizsgálat eredményei bizonyos mértékig lehetővé teszik az általános toxicitás hiányában is fellépő, a fejlődésre gyakorolt hatások megkülönböztetését azoktól, amelyeket az anyaállatra is toxikus szintek idéznek elő (27).

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A jelentésnek az alábbi konkrét információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

- fizikai jelleg és ahol fontos, fizikai-kémiai tulajdonságok;
- megjelölés, és ezen belül – ha ismert, vagy meghatározták – a CAS-szám;
- tisztaság.

Vivőanyag (ha szükséges):

- ha a vivőanyag nem víz, akkor ennek indoklása.

Kísérleti állatok:

- az alkalmazott faj és törzs;
- az állatok száma és életkora;
- származás, tartási körülmények, takarmány stb.;
- az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetén.

Kísérleti körülmények:

- a dózisszintek megválasztásának indoklása;
- a vizsgálandó anyag formulázásával/a táplálék előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenitásával kapcsolatos információk;
- a vizsgálandó anyag adagolásának adatai;
- adott esetben a vizsgálandó anyag táplálékban/ivóvízben lévő koncentrációjának (ppm) átszámítása a tényleges dózisra (mg/testtömeg-kg/nap);
- környezeti feltételek;
- a táplálék és az ivóvíz minőségével kapcsolatos adatok.

Eredmények:

Anyai toxikus válaszadatok a dózis függvényében, ezen belül többek között:

- az állatok száma a vizsgálat kezdetén, az életben maradt állatok száma, továbbá a vemhes, az abortáló és a koraellő állatok száma;
- az esetleges vizsgálat közbeni elhullás időpontja, vagy hogy az állat életben maradt-e az exterminálás időpontjáig;
- a tervezett exterminálás előtt elpusztult állatok adatait is bele kell foglalni a jelentésbe, de a csoportok közötti statisztikai összehasonlításokba nem;
- az egyes rendellenes klinikai tünetek megfigyelésének időpontja, valamint ezek későbbi lefolyása;
- testtömeg, testtömeg-változás és a vemhes méhek tömege, ezen belül adott esetben a vemhes méh tömegével korrigált testtömeg-változás;
- táplálékfogyasztás és, ha mérve volt, vízfogyasztás;
- boncolási eredmények, ezen belül a méh tömege;
- a jelentésben fel kell tüntetni az anyai és fejlődési hatásokra vonatkozó NOAEL-értékeket is.

Fejlesztési végpontok a dózis függvényében azokra az almokra vonatkozóan, ahol beágyazódás történt, ezen belül:

- a sárgatestek száma;
- a beágyazódások száma, az élő és elhalt magzatok és a felszívódások száma, valamint százalékos aránya;
- a beágyazódás előtti és utáni veszteségek száma és százalékos aránya.

Fejlesztési végpontok a dózis függvényében azokra az almokra vonatkozóan, ahol élő magzatok vannak, ezen belül:

- az élő utódok száma és százalékos aránya;
- ivararány;
- a magzatok testtömege, lehetőleg ivaronként külön és együtt is;
- külső, lágy szöveti és vázrendszeri deformitások, valamint más lényeges elváltozások;
- adott esetben a kategorizálás kritériumai;
- a külső, lágy szöveti és vázrendszeri elváltozásokat mutató magzatok és almok összesített száma és százalékos aránya, valamint az egyedi rendellenességek és más lényeges elváltozások típusa és gyakorisága.

Az eredmények diszkussziója.

Következtetések.

4. HIVATKOZÁSOK

- (1) Kavlock R.J. et al. (1996) A Simulation Study of the Influence of Study Design on the Estimation of Benchmark Doses for Developmental Toxicity. *Risk Analysis* 16; 399–410.
- (2) Kimmel, C.A. and Francis, E.Z. (1990) Proceedings of the Workshop on the Acceptability and Interpretation of Dermal Developmental Toxicity Studies. *Fundamental and Applied Toxicology* 14; 386–398.
- (3) Wong, B.A., et al. (1997) Developing Specialized Inhalation Exposure Systems to Address Toxicological Problems. *CIIT Activities* 17; 1–8.
- (4) US Environmental Protection Agency (1985) Subpart E-Specific Organ/Tissue Toxicity, 40 CFR 798.4350: Inhalation Developmental Toxicity Study.
- (5) Salewski, E. (1964) Faerbermethode zum Makroskopischen Nachweis von Implantations Stellen am Uterus der Ratte. *Naunyn-Schmeidebergs Archiv für Pharmakologie und Experimentelle Pathologie* 247; 367.
- (6) Edwards, J.A. (1968) The external Development of the Rabbit and Rat Embryo. In *Advances in Teratology*. D.H.M. Woolam (ed.) Vol. 3. Academic Press, NY.
- (7) Inouye, M. (1976) Differential Staining of Cartilage and Bone in Fetal Mouse Skeleton by Alcian Blue and Alizarin Red S. *Congenital Anomalies* 16; 171–173.

- (8) Igarashi, E. et al. (1992) Frequency Of Spontaneous Axial Skeletal Variations Detected by the Double Staining Technique for Ossified and Cartilaginous Skeleton in Rat Foetuses. *Congenital Anomalies* 32; 381–391.
- (9) Kimmel, C.A. et al. (1993) Skeletal Development Following Heat Exposure in the Rat. *Teratology* 47; 229–242.
- (10) Marr, M.C. et al. (1988) Comparison of Single and Double Staining for Evaluation of Skeletal Development: The Effects of Ethylene Glycol (EG) in CD Rats. *Teratology* 37; 476.
- (11) Barrow, M.V. and Taylor, W.J. (1969) A Rapid Method for Detecting Malformations in Rat Foetuses. *Journal of Morphology* 127; 291–306.
- (12) Fritz, H. (1974) Prenatal Ossification in Rabbits as Indicative of Foetal Maturity. *Teratology* 11; 313–320.
- (13) Gibson, J.P. et al. (1966) Use of the Rabbit in Teratogenicity Studies. *Toxicology and Applied Pharmacology* 9; 398–408.
- (14) Kimmel, C.A. and Wilson, J.G. (1973) Skeletal Deviation in Rats: Malformations or Variations? *Teratology* 8; 309–316.
- (15) Marr, M.C. et al. (1992) Developmental Stages of the CD (Sprague-Dawley) Rat Skeleton after Maternal Exposure to Ethylene Glycol. *Teratology* 46; 169–181.
- (16) Monie, I.W. et al. (1965) Dissection Procedures for Rat Foetuses Permitting Alizarin Red Staining of Skeleton and Histological Study of Viscera. Supplement to *Teratology Workshop Manual*, pp. 163–173.
- (17) Spark, C. and Dawson, A.B. (1928) The Order and Time of appearance of Centers of Ossification in the Fore and Hind Limbs of the Albino Rat, with Special Reference to the Possible Influence of the Sex Factor. *American Journal of Anatomy* 41; 411–445.
- (18) Staples, R.E. and Schnell, V.L. (1964) Refinements in Rapid Clearing Technique in the KOH-Alizarin Red S Method for Fetal Bone. *Stain Technology* 39; 61–63.
- (19) Strong, R.M. (1928) The Order Time and Rate of Ossification of the Albino Rat (*Mus Norvegicus Albinus*) Skeleton. *American Journal of Anatomy* 36; 313–355.
- (20) Stuckhardt, J.L. and Poppe, S.M. (1984) Fresh Visceral Examination of Rat and Rabbit Foetuses Used in Teratogenicity Testing. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* 4; 181–188.
- (21) Walker, D.G. and Wirtschafter, Z.T. (1957) *The Genesis of the Rat Skeleton*. Thomas, Springfield, IL.
- (22) Wilson, J.G. (1965) Embryological Considerations in Teratology. In *Teratology: Principles and Techniques*, Wilson J.G. and Warkany J. (eds). University of Chicago, Chicago, IL, pp 251–277.
- (23) Wilson, J.G. and Fraser, F.C. (eds). (1977) *Handbook of Teratology*, Vol. 4. Plenum, NY.
- (24) Varnagy, L. (1980) Use of Recent Fetal Bone Staining Techniques in the Evaluation of Pesticide Teratogenicity. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 28; 233–239.
- (25) Staples, R.E. (1974) Detection of visceral Alterations in Mammalian Foetuses. *Teratology* 9; 37–38.
- (26) Van Julsingha, E.B. and C.G. Bennett (1977) A Dissecting Procedure for the Detection of Anomalies in the Rabbit Foetal Head. In: *Methods in Prenatal Toxicology* Neubert, D., Merker, H.J. and Kwasigroch, T.E. (eds.). University of Chicago, Chicago, IL, pp. 126–144.
- (27) US Environmental Protection Agency (1991) Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment. Federal Register 56; 63798–63826.
- (28) Wise, D.L. et al. (1997) Terminology of Developmental Abnormalities in Common Laboratory Mammals (Version 1) *Teratology* 55; 249–292.

7. számú melléklet az 56/2005. (XI. 29.) EüM–KvVM–BM együttes rendelethez**B.35. KÉTGENERÁCIÓS REPRODUKCIÓS TOXICITÁSI VIZSGÁLAT****1. MÓDSZER**

Ez a módszer az OECD TG 416 (2001) módszer megfelelője.

1.1. Bevezetés

E kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálati módszer segítségével általános információk nyerhetők egy vizsgálandó anyagnak a hím és női szaporítórendszer épségére és teljesítőképességére, ezen belül az ivarmirigyek működésére, az ivari ciklusra, a párzási viselkedésre, a fogantatásra, a vemhességre, az ellésre, a szoptatásra és az elválasztásra, valamint az utódok növekedésére és fejlődésére gyakorolt hatásaival kapcsolatban. A vizsgálat emellett információkat nyújthat a vizsgálandó anyagnak az újszülött kori morbiditásra, mortalitásra gyakorolt hatásaival kapcsolatban, előzetes adatokat szolgáltat a prenatális és posztnatális fejlődési toxicitásról, illetve útmutatóként szolgálhat a későbbi vizsgálatokhoz is. Az F1 generáció növekedésének és fejlődésének tanulmányozásán kívül e vizsgálati módszer segítségével a hím és női szaporítórendszer épsége és teljesítőképessége, valamint az F2 generáció növekedése és fejlődése is tanulmányozható. A fejlődési toxicitással és a funkcionális defektusokkal kapcsolatban további információk úgy szerezhetők, ha ezt az eljárást adott esetben a fejlődési toxicitási és/vagy fejlődési neurotoxicitási módszereket segítségül hívva további vizsgálati protokollokkal egészítik ki, de az említett végpontok a megfelelő vizsgálati módszerek alkalmazásával külön vizsgálatokban is tanulmányozhatók.

1.2. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálandó anyagot fokozatosan növekvő dózisokban kell adagolni hím és nőstény állatok több csoportjának. A P generációba tartozó hímeknek egyrészt a növekedés során, másrészt legalább egy teljes spermaképződési ciklus során (egérben körülbelül 56 nap, patkányban pedig körülbelül 70 nap) kell adagolni az anyagot ahhoz, hogy bármilyen, a spermaképződésre gyakorolt káros hatást ki lehessen váltani. A spermára gyakorolt hatásokat egy sor spermaparaméter (pl. spermamorfológia és -motilitás), valamint szövetpreparátumok és részletes kórszövettani vizsgálatok segítségével kell meghatározni. Ha rendelkezésre állnak megfelelő időtartamú, pl. legalább 90 napos ismételt dózissal vizsgálatokból származó, a spermaképződéssel kapcsolatos adatok, a P generációba tartozó hímeket nem kell bevonni az értékelésbe. A spermamintákat vagy az azokról készült digitális felvételeket azonban ajánlatos az esetleges későbbi értékelések céljára megőrizni, illetve elmenteni. A P generációba tartozó nőstényeknek egyrészt a növekedés során, másrészt több teljes ivari ciklus során kell adagolni a vizsgálandó anyagot ahhoz, hogy észlelhetők legyenek az ivari ciklus szabályosságára kifejtett esetleges káros hatások. A vizsgálandó anyagot a párzás és az ennek eredményeként létrejövő vemhesség során, sőt egészen az F1 utódok elválasztásának ideje alatt is kell adagolni a szülőknek (azaz a P generációba tartozó állatoknak). Az elválasztáskor a kezelést az F1 utódokon kell folytatni, egészen felnőtté válásukig, párzásukig, illetve az F2 generáció létrejöttéig, amíg meg nem történik az F2 generáció elválasztása.

Minden állaton klinikai megfigyeléseket és kóronctani vizsgálatokat kell végezni a toxicitás jeleinek kimutatása érdekében, és külön hangsúlyt kell fektetni a hím és női szaporítórendszer épségére és teljesítőképességére, valamint az utódok növekedésére és fejlődésére.

1.3. A vizsgálati módszer ismertetése**1.3.1. Az állatfaj kiválasztása**

A vizsgálatok céljára a preferált állatfaj a patkány. Ettől eltérő fajok alkalmazását megfelelően indokolni kell, és a megfelelő módosításokra is szükség lesz. Nem szabad olyan törzseket alkalmazni, amelyek kevésbé termékenyek, vagy amelyekben magas a fejlődési defektusok előfordulási gyakorisága. A vizsgálat megkezdésekor az egyes kísérleti állatok testtömegének csak minimális mértékben szabad különböznie egymástól, és egyik ivar esetében sem térhet el 20%-nál magasabb mértékben az ivar átlagától.

1.3.2. Az állatok tartásának és etetésének körülményei

A kísérleti helyiség hőmérsékletének 22 °C (±3 °C)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30%-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70%-ot, a célértéknek 50 és 60% között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását az is befolyásolhatja, hogy ha a vizsgálandó anyagot táplálékkal adják be, akkor azok megfelelő módon keveredjenek el egymással.

Az állatok egyedileg vagy azonos ivarú egyedekből álló kisebb csoportokban is tarthatók. A párosztatásokat erre a célra alkalmas ketrecekben kell végezni. Ha meggyőződtek a párzás megtörténtéről, a párosztatott nőstényeket egyedileg kell elhelyezni ellető vagy fiaztató ketrecekben. A párosztatott patkányokat kis csoportokban is lehet tartani, de az ellés

előtt egy vagy két nappal külön kell választani őket. Az ellés közeledtével a pároztatott állatok számára megfelelő és meghatározott fészekrakó anyagot kell biztosítani.

1.3.3. Az állatok előkészítése

Legalább 5 napon át a laboratórium körülményeihez szoktatott, egészséges állatokat kell alkalmazni, amelyek korábban nem voltak más kísérletnek alanyai. A kísérleti állatok jellemzésekor meg kell adni az állat fajtát, törzsét, származását, ivarát, testtömegét és/vagy életkorát. Ismerni kell, hogy mely állatok között áll fenn testvéri viszony, hogy elkerülhető legyen ezek pároztatása. Az állatokat véletlenszerűen kell beosztani a kontroll- és a kezelési csoportokba. A ketrecek úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezése jelentette lehetséges hatásokat. Minden állatot egyedi azonosítószámmal kell ellátni. A P generáció esetében ezt még a kezelés megkezdése előtt meg kell tenni. Az F1 generáció esetében a későbbi pároztatásra kiválasztott állatokat az elválasztáskor egyedi azonosítóval kell ellátni. Minden kiválasztott F1 állat esetében meg kell őrizni azokat az adatokat, amelyek rögzítik, hogy az állat melyik alomból származik. Ha az utódok testtömegének mérését vagy bármely más funkcionális vizsgálat elvégzését is fontolóra veszik, akkor ajánlatos a születés után a lehető leghamarabb azonosítóval ellátni a kölyköket.

A kezelés megkezdésekor a szülőknek (P generáció) körülbelül 5–9 hetesnek kell lenniük. Amennyire csak megoldható, az állatoknak az összes vizsgálati csoportban nagyjából azonos testtömegűnek és korúnak kell lenniük.

1.4. Eljárás

1.4.1. Az állatok száma és ivara

Minden kezelési és kontrollcsoportban elegendő számú állatnak kell lennie ahhoz, hogy az elléskor vagy akörül lehetőleg legalább 20 vemhes nőstény tartozzon egy-egy csoportba. A kezeléssel összefüggésben nemkívánatos hatásokat (pl. sterilitást vagy magas dózisban túlzott toxicitást) kiváltó anyagok esetében előfordulhat, hogy ezt nem lehet megoldani. A cél az, hogy elegendő számú vemhesség jöjjön létre az anyagnak a termékenységre, a vemhességre, az anyai viselkedésre és szoptatásra, az F1 utódoknak a fogantatástól az ivarérettségig történő növekedésére és fejlődésére, valamint az F2 utódoknak az elválasztásig tartó időszakban történő fejlődésére gyakorolt esetleges hatások értékeléséhez. Nem feltétlenül teszi érvénytelenné tehát a vizsgálatot az, ha nem lehet megoldani, hogy a kívánt számú (azaz 20) vemhes állat álljon rendelkezésre, és ennek jelentőségét minden egyes esetben külön-külön kell értékelni.

1.4.2. A dózisok előkészítése

A vizsgálandó anyagot ajánlatos orálisan adagolni (a táplálékkal, az ivóvízzel vagy mesterséges táplálással), kivéve, ha más beadási módot (pl. dermális vagy inhalációs alkalmazást) tartanak megfelelőbbnek.

Ahol szükséges, a vizsgálandó anyagot megfelelő vivőanyagban kell feloldani vagy szuszpendálni. Ahol lehet, első sorban vizes oldatot/szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (pl. kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy emulziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot. A víztől eltérő vivőanyagok esetében ismerni kell a vivőanyag toxikus jellemzőit. Meg kell határozni továbbá azt is, hogy a vizsgálandó anyag mennyire stabil az adott vivőanyagban.

1.4.3. Adagolás

Legalább három dózist és ezzel párhuzamos kontrollt kell alkalmazni. Hacsak a vizsgálandó anyag fizikai-kémiai jellege vagy biológiai hatásai nem szabnak ennek határt, a legmagasabb dózist úgy kell megválasztani, hogy toxicitást idézzen elő, de ne okozzon elhullást vagy súlyos szenvedést. Váratlan elhullások esetén, ha a szülői (P) generáció elhullási aránya alacsonyabb, mint körülbelül 10 százalék, a vizsgálat még általában elfogadható. A dózisok csökkenő sorrendjét úgy kell megválasztani, hogy kimutathatók legyenek az esetleges dózisfüggő hatások és a nem észlelhető káros hatás szintje (NOAEL). A csökkenő dózisszintek meghatározásához gyakran optimális a 2–4-szeres intervallumok alkalmazása, és nagyon nagy intervallumok (pl. 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazása esetén gyakran előnyös a dózisok közé egy negyedik vizsgálati csoportot is beiktatni. A táplálékkal való beadást alkalmazó vizsgálatok esetében a dózisintervallum nem lehet háromszorosnál nagyobb. A dózisszinteket a korábbi toxicitási adatok és különösen az ismételt dózisú vizsgálatok eredményeinek figyelembevételével kell megválasztani. A vizsgálandó vegyület és a szerkezetileg rokon anyagok metabolizmusával és kinetikájával kapcsolatban rendelkezésre álló összes információt is figyelembe kell venni. Ezek az információk segítik majd az adagolási rend megfelelő voltának igazolását is.

A kontrollcsoport egy kezeletlen csoport, vagy ha a vizsgálandó anyag beadásához vivőanyagot használnak, akkor egy vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport. A kontrollcsoportba tartozó állatokat a vizsgálandó anyag beadásától eltekintve ugyanolyan módon kell kezelni, mint a vizsgálati csoportokban lévőket. Vivőanyag alkalmazása esetén a kontrollcsoportban a legnagyobb alkalmazott mennyiségben kell beadni a vivőanyagot. Ha a vizsgálandó anyagot a táplálékkal adják be, és emiatt csökken a táplálékfogyasztás vagy hasznosítás, akkor szükség lehet egy párban etetett kontrollcsoport alkalmazására is. A párhuzamos párban etetett kontrollcsoport helyett felhasználhatók olyan kontrollcsoportokkal végzett vizsgálatokból származó adatok is, amelyek célja a csökkent táplálékfogyasztás reprodukív paraméterekre gyakorolt hatásának értékelése.

A vivőanyagok vagy egyéb adalékok esetében a következő jellemzőket kell figyelembe venni: a vizsgálandó anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára vagy visszatartására gyakorolt hatások; a vizsgálandó anyag kémiai tulaj-

donságaira gyakorolt hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit; valamint az állatok táplálék- és vízforrásztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások.

1.4.4. Határérték-vizsgálat

Ha egy egyetlen, legalább 1000 mg/testtömeg-kg/nap orális dózis felhasználásával végzett, vagy táplálékkal vagy ivóvízzel történő beadás esetén a táplálékban vagy ivóvízben ezzel egyenértékű százalékos arány alkalmazásával történő és az itt ismertetett eljárások szerint lefolytatott vizsgálat sem a szülőknél, sem utódaikban nem idéz elő észlelhető toxicitást, és ha a szerkezetileg és/vagy metabolizmus szempontjából rokon vegyületekkel kapcsolatos adatok alapján nem várható toxicitás, megfontolható a több dózisszinttel végzett teljes vizsgálat elhagyása. Határérték-vizsgálatot kell minden esetben alkalmazni, kivéve, ha a humán expozíció magasabb orális dózis alkalmazását teszi szükségessé. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálandó anyag fizikai-kémiai tulajdonságai – így például oldhatósága – gyakran előre jelezhetik, illetve korlátozhatják a lehetséges expozíciós szint maximumát.

1.4.5. A dózisok beadása

Az állatoknak a hét minden napján adagolni kell a vizsgálandó anyagot. A preferált beadási mód az orális (táplálékkal, ivóvízzel vagy mesterséges táplálással történő bevitel). Az ettől eltérő beadási módok használatát meg kell indokolni, és ennek megfelelő módosításokra is szükség lehet. A megfelelő hosszúságú kísérleti időszak során minden állatnak azonos módszerrel kell beadni az anyagot. Ha a vizsgálandó anyagot mesterséges táplálással juttatják be, gyomorszondát kell alkalmazni. Az egyszerre beadott folyadéktérfogat nem haladhatja meg az 1 ml/100 g testtömeg-arányt (kukoricacsíra-olajban történő adagolás esetén a maximum a 0,4 ml/100 g testtömeg-arány), kivéve vizes oldatok esetében, amikor 2 ml/100 g testtömeg-arány is alkalmazható. Az irritáló vagy korróziós hatású anyagok kivételével, amelyek esetében a magasabb koncentrációk súlyosabb hatásokat okoznak, minimálisra kell csökkenteni a térfogatbeli eltéréseket, amihez a koncentrációt kell úgy beállítani, hogy minden dózisszinten állandó térfogatot lehessen biztosítani. A mesterséges táplálást alkalmazó vizsgálatokban a kölykök általában mindaddig csak közvetve, az anyatején keresztül kapják a vizsgálandó anyagot, amíg az elválasztáskor meg nem kezdődik a közvetlen adagolás. A táplálékkal vagy ivóvízzel történő adagolást alkalmazó vizsgálatok esetében a kölykök közvetlenül is megkapják a vizsgálandó anyagot, amikor a szoptatási időszak utolsó hetében önállóan is elkezdnek táplálkozni.

A táplálékkal vagy ivóvízzel bejuttatott anyagok esetében fontos, hogy a vizsgálandó anyag mennyisége ne zavarja a normál táplálkozást vagy vízháztartást. Ha a vizsgálandó anyagot táplálékkal juttatják be, vagy a táplálékbeli koncentrációt (ppm), vagy pedig az állat testtömegére számított dózist kell állandó értéken tartani, és meg kell adni, hogy melyik alternatívát alkalmazzák. A mesterséges táplálással bejuttatott anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és legalább hetente újra be kell állítani ahhoz, hogy az állat testtömegéhez viszonyítva állandó értéken lehessen tartani a dózist. A mesterséges táplálással bejuttatott és testtömegén alapuló dózis beállításakor figyelembe kell venni a méhlepénybeli eloszlással kapcsolatos információkat is.

1.4.6. A kísérleti program

A P generációba tartozó hímek és nőstények napi kezelését 5–9 hetes korukban kell elkezdeni. Az F1 hímek és nőstények napi kezelését az elválasztáskor kell elkezdeni; nem szabad megfedkezni arról, hogy ha vizsgálandó anyagot táplálékkal vagy ivóvízzel adagolják, az F1 utódok közvetlen expozíciója már a szoptatási időszakban megkezdődhet. Az adagolást mindkét ivar (P és F1) esetében legalább 10 héten át folytatni kell a párzási időszak előtt. Az adagolást a 2 hetes pároztatási időszakban sem szabad abbahagyni egyik ivar esetében sem. Amikor a reprodukív hatások értékelése szempontjából már nincs szükség a hím állatokra, humánus módon exterminálni kell őket és megvizsgálni. A szülői (P) generációba tartozó nőstények esetében az adagolást a vemhesség ideje alatt is folytatni kell, egészen az F1 generáció elválasztásáig. Fontolóra kell venni az adagolási rend módosítását a vizsgálandó anyaggal, ezen belül a meglévő toxicitási adatokkal, az anyagszere fokozódásával vagy biológiai felhalmozódással kapcsolatban rendelkezésre álló információk alapján. Az egyes állatoknak beadandó dózist általában a legutóbbi testtömeg-mérés eredménye alapján kell meghatározni. A vemhesség utolsó trimeszterében azonban óvatosan kell eljárni a dózis beállításakor.

A P és F1 hímek és nőstények kezelését exterminálásukig kell folytatni. Minden felnőtt P és F1 hím és nőstényt humánus módon exterminálni kell, ha már nincs rájuk szükség a reprodukív hatások értékeléséhez. Az elválasztás után a pároztatásra ki nem választott F1 utódokat és minden F2 utódot humánus módon exterminálni kell elválasztásukat követően.

1.4.7. A pároztatási eljárás

1.4.7.1. A szülői (P) generáció pároztatása

Minden egyes pároztatáskor a nőstényt egy azonos dózissal kezelt hímmel kell összerakni (1:1 pároztatás), és addig kell együtt hagyni őket, amíg a párzás meg nem történik, vagy 2 hét el nem telik. Mindennap meg kell vizsgálni, hogy a nőstényben észlelhető-e ondó vagy hüvelydugó. A vemhesség 0. napja definíció szerint az a nap, amikor hüvelydugó vagy ondó figyelhető meg a nőstényben. Ha a pároztatás sikertelen volt, fontolóra kell venni a nőstények újrápároztatását egy azonos csoportbeli és már sikeresen pároztatott hímmel. Az adatok között egyértelműen fel kell tüntetni a pároztatott párokat. Kerülni kell a testvérek pároztatását.

1.4.7.2. F1 pároztatás

Az F1 utódok pároztatásakor minden alomból legalább egy hím és egy nőstény állatot kell kiválasztani az elválasztásakor, hogy később egy másik alomból származó, de azonos csoportba tartozó állattal pároztatva létrejöjjön az F2 generáció. A kölykök kiválasztását minden egyes alomban véletlenszerűen kell elvégezni, feltéve, hogy nincs szignifikáns különbség az egy alomba tartozó állatok testtömege vagy külső megjelenése között. Ha azonban van különbség, akkor minden alomból a legrepresentatívabb egyedet kell kiválasztani. A gyakorlatban ezt a testtömeg alapján lehet a legjobban elvégezni, de esetenként megfelelőbb lehet a külső megjelenés alapján tenni ezt. Mindaddig nem szabad pároztatni az F1 utódokat, amíg teljesen ivaréretté nem válnak.

Az utód nélküli pároknál meg kell vizsgálni a látszólagos terméketlenség okát. Ennek keretében lehetőség biztosítható számukra más olyan hímekkel vagy nőstényekkel való párzásra, amelyeket már sikeresen pároztattak, vagy el lehet végezni a szaporítószervek mikroszkópos vizsgálatát, vagy meg lehet vizsgálni az ivari ciklust vagy a spermaképződést.

1.4.7.3. Második pároztatás

Bizonyos esetekben, így például ha az alomméret a kezeléssel összefüggésben megváltozik, vagy ha az első pároztatásakor nem egyértelmű hatásokat figyelnek meg, ajánlatos a felnőtt P és F1 állatokat újrápároztatni és így egy második almot kialakítani. Ajánlatos újrápároztatni azokat a hímeket és nőstényeket is, amelyek bizonyítottan nemzőképes ellenkező nemű partnerekkel sem hoztak utódokat. Ha a két generáció bármelyikében szükségesnek látszik egy második alom kialakítása, az állatokat körülbelül egy héttel az utolsó alom elválasztása után kell újrápároztatni.

1.4.7.4. Az alom mérete

Hagyni kell, hogy az állatok a szokásos módon eljék és neveljék utódaikat az elválasztásig. Az alomméret standardizálása nem kötelező. Ha azonban elvégezzük a standardizálást, részletesen ismertetni kell az erre alkalmazott módszert.

1.5. Megfigyelések

1.5.1. Klinikai megfigyelések

Minden nap klinikai megfigyelést kell végezni, és a mesterséges táplálással való adagolás a beadás időpontjának meghatározásakor azt is figyelembe kell venni, hogy a beadás után a hatások várhatóan mikor érik el a maximumukat. A viselkedésbeli változásokat, a nehéz vagy hosszan tartó ellés jeleit és a toxicitás minden tünetét rögzíteni kell a jegyzőkönyvben. Legalább hetente egyszer alaposabban is meg kell vizsgálni az állatokat, célszerűen akkor, amikor a testtömeg-mérésre kerül sor. Naponta kétszer, illetve a hétvégeken adott esetben naponta egyszer meg kell vizsgálni az állatokat megbetegedés és elhullás szempontjából.

1.5.2. A szülők testtömege, valamint táplálék- és vízfogyasztása

A kezelés első napján, majd azt követően legalább hetente egyszer meg kell mérni a szülők (P és F1) testtömegét. Az anyaállatokat (P és F1) legalább a vemhesség 0., 7., 14. és 20. vagy 21. napján kell megmérni, a szoptatás időszakában pedig ugyanazokon a napokon, amikor az utódokat is megméri, valamint az állatok exterminálásának napján is. A megfigyeléseket minden egyes felnőtt állat esetében külön-külön kell rögzíteni. A pároztatás előtti időszakban és a vemhesség alatt legalább hetente meg kell mérni a táplálékfogyasztást. Ha a vizsgálandó anyagot az ivóvízzel adagolják, legalább hetente egyszer a vízfogyasztást is meg kell mérni.

1.5.3. Ivári ciklus

Az ivári ciklus hosszát és szabályosságát hüvelykenet alkalmazásával kell meghatározni a P és F1 nőstényekben a pároztatás előtt és adott esetben a pároztatás során mindaddig, amíg be nem bizonyosodik, hogy párzás történt. A hüvelyi/méhnyaki sejtek vétele során vigyázni kell arra, hogy meg ne sérüljön a nyálkahártya, és ezáltal nehogy álvemhesség alakuljon ki (1).

1.5.4. Spermaparaméterek

A vizsgálat befejezésekor minden P és F1 hím esetében meg kell mérni a here és a mellékhere, valamint a kórszövetetani vizsgálatokra megőrzött minden szerv közül az egyiknek a tömegét (lásd 1.5.7. és 1.5.8.1. szakasz). A P és F1 hímek minden egyes csoportjából egy-egy, legalább tíz hímből álló részhalmoz esetében a megmaradó heréket és mellékheréket a homogenizálásnak ellenálló spermátidák és mellékhere farki részében tárolt ondósejtek számlálására kell felhasználni. A hímek ugyanezen részhalmozában spermát kell gyűjteni a mellékhere farki részéből vagy az ondóvezetékéből, amelyet a spermamotilitás és -morfológia vizsgálatára kell felhasználni. Ha kezeléssel összefüggő hatásokat észlelnek, vagy ha más vizsgálatok eredményei a spermaképződésre gyakorolt lehetséges hatásokra utalnak, a sperma értékelését az összes dóziscsoportban minden hímben el kell végezni; egyéb esetben elegendő lehet, ha a számlálást csak a kontroll- és a magas dózissal kezelt P és F1 hímekben végzik el.

Meg kell határozni a herében lévő homogenizálásnak ellenálló spermátidák és a mellékhere farki részében található ondósejtek teljes számát (2) (3). A mellékhere farki részében lévő ondókészlet nagyságát a kvalitatív értékelésekhez használt szuszpenzióban lévő ondó koncentrációja és mennyisége, valamint a fennmaradt mellékhere farki részéből kinyert szövet ezt követő darálásával és/vagy homogenizálásával kinyert ondósejtek száma alapján lehet meghatározni. Az összes kezelési csoportban közvetlenül az exterminálás után kell elvégezni a számlálást a hímek e kiválasztott részhalmozában, kivéve, ha video- vagy digitális felvételt készítenek, vagy ha a mintákat későbbi elemzésig lefagyasztják. Ilyen

esetekben a kontroll- és a magas dózissal kezelt csoportot célszerű először megvizsgálni. Ha nem észlelhető kezeléssel összefüggő hatás (pl. az ondósejtszámra, valamint a motilitásra és morfológiára gyakorolt hatás), a többi dóziscsoportot nem kell megvizsgálni. Ha a magas dózissal kezelt csoportban kezeléssel összefüggő hatásokat észlelünk, akkor az alacsonyabb dóziscsoportokat is meg kell vizsgálni.

Az exterinálás után azonnal értékelni kell vagy videofelvételen rögzíteni kell a mellékheréből (vagy ondósinórból) kinyert ondósejtek motilitását. A spermát a károsodások minimális szintre szorítása mellett kell kinyerni, majd elfogadható módszerek segítségével kell hígítani a motilitásvizsgálathoz (4). Az előrehaladó mozgást mutató ondósejtek százalékos arányát vagy szubjektíven, vagy objektíven kell meghatározni. Ha számítógéppel támogatott motilitásvizsgálatot alkalmaznak (5) (6) (7) (8) (9) (10), az előrehaladó mozgás levezetése az átlagos pályasebesség és egyenes vonalú mozgás vagy lineáris index felhasználó által beállított küszöbértékein alapul. Ha a boncoláskor a mintákról videofelvételt (11) készítenek, vagy a képeket más módon rögzítik, esetleg csak a kontroll- és a nagy dózissal kezelt P és F1 hímek esetében kell további elemzést végezni, kivéve, ha kezeléssel összefüggő hatásokat észlelnek; ebben az esetben ugyanis az alacsonyabb dózissal kezelt csoportokat is értékelni kell. Videofelvétel vagy digitális képek hiányában a boncoláskor az összes kezelési csoportba tartozó valamennyi állat mintáját ki kell elemezni.

Egy mellékheréből (vagy ondóvezetékéből) származó spermaminta morfológiai értékelését is el kell végezni. Az ondósejteket (mintánként legalább 200-at) fixált nedves preparátum (12) formájában kell megvizsgálni, és normálnak vagy rendellenesnek kell minősíteni. A morfológiai sperma-rendellenességek közé tartoznak például a fúzió, az izolált fejek és a torz fej és/vagy farok. Az értékelést a hímeknek az egyes dóziscsoportból kiválasztott részhalmazán, az állatok exterinálása után azonnal, vagy a video- vagy digitális felvételek alapján egy későbbi időpontban kell elvégezni. Fixálás után a keneteket is el lehet tenni későbbi elemzésre. Ilyen esetekben a kontroll- és magas dózissal kezelt csoportokat célszerű először megvizsgálni. Ha nem észlelnek kezeléssel összefüggő hatásokat (pl. az ondósejtek morfológiájára gyakorolt hatásokat), akkor nem kell elvégezni a többi dóziscsoport elemzését. Ha a magas dózissal kezelt csoportban kezeléssel összefüggő hatásokat tapasztalnak, akkor az alacsonyabb dózissal kezelt csoportokat is ki kell értékelni.

Ha a fenti spermavizsgálati paramétereket egy legalább 90 napos szisztémás toxicitási vizsgálatban már meghatározták, akkor a kétgenerációs vizsgálatban nem kell ezt feltétlenül megismételni. A P generáció spermamintáit vagy az azokról készült digitális felvételeket azonban, ha szükséges, ajánlatos az esetleges későbbi értékelések céljára megőrizni, illetve elmenteni.

1.5.5. Az utódok

Az ellés után minden almot a lehető leghamarabb meg kell vizsgálni (0. szoptatási nap) a kölykök számának és ivarának, a halvaszületések és élveszületések számának, valamint a makroszkópos rendellenességeknek a megállapítására. Ha nem történt maceráció, a 0. napon elhalva talált kölykökben lehetőség szerint meg kell vizsgálni az esetleges defektusokat, és meg kell állapítani az elhullás okát, majd konzerválni kell őket. Az élő kölyköket meg kell számolni, és meg kell mérni a testtömegüket a születéskor (0. szoptatási nap), vagy az 1. napon, majd ezt követően a rendszeres testtömeg-mérési napokon, azaz pl. a szoptatás 4., 7., 14. és 21. napján. Az anyaállatokban vagy az utódokban megfigyelt fizikai vagy viselkedésszerű rendellenességeket is fel kell jegyezni.

Az utódok fizikai fejlődését főleg a testtömeg-gyarapodás alapján kell nyomon követni. Az egyéb fizikai paraméterek (pl. a fülek és a szemek kinyílása, fogzás, szőrnövekedés) kiegészítő információkat szolgáltathatnak, de ezeket az adatokat lehetőleg a szexuális éréssel összefüggésben kell értékelni (pl. kor és testtömeg a hüvelykinyílás vagy a makk-fityma szétválás időpontjában) (13). Ha nem történtek korábban külön ilyen vizsgálatok, akkor ajánlatos az elválasztás előtt és/vagy után funkcionális vizsgálatokat (pl. motoros aktivitás, szenzoros működés, a reflexek kifejlődése) is végezni az F1 utódokon, különösen a szexuális éréssel kapcsolatos vizsgálatokat. Az elválasztott és párosztatásra kiválasztott F1 utódok esetében meg kell határozni azt az életkort, amikor a hüvelykinyílás, illetve a fitymaelválás megtörténik. Ha az F1 generáció ivararányában vagy az ivarérettség idejében észlelt változások azt indokolják, a születés utáni 0. napon meg kell mérni az anogenitális távolságot az F2 utódokban.

Kihagyhatók a funkcionális vizsgálatokból azok a csoportok, amelyek egyébként egyértelműen káros hatások tüneteit mutatják (pl. a testtömeg-gyarapodás szignifikáns lassulása stb.). Funkcionális vizsgálatok végzése esetén a párosztatásra kiválasztott kölyköket nem szabad e vizsgálatokba bevonni.

1.5.6. Makroszkópos boncolás

A vizsgálat befejezésekor vagy a vizsgálat során történt elhullás esetén minden szülő (P és F1 állatok), minden külső rendellenességet vagy klinikai tüneteket mutató kölyök, valamint az F1 és az F2 generációból is egy-egy véletlenszerűen kiválasztott kölyök/ivar/alom esetében makroszkópos vizsgálatot kell végezni az esetleges strukturális rendellenességek vagy kórbonctani elváltozások feltárására. Külön figyelmet kell szentelni a szaporítószerveknek. Az elhullásközeli állapotba került, és ezért humánus módon exterinált vagy a nem macerált, elpusztult kölykökben meg kell határozni az esetleges defektusokat és/vagy az elhullás okát, majd konzerválni kell őket.

Az először ellő nőtények méhében kórszövettani értékelés nélkül kell megvizsgálni a beágyazódási helyek jelenlétét és számát.

1.5.7. A szervek tömege

A vizsgálat befejezésekor a P és F1 állatoknál meg kell határozni a testtömeget, valamint az alábbi szervek tömegét (a páros szervek tagjait külön-külön kell megmérni):

- méh, petefészkek;
- herék, mellékherék (teljes és farki rész);
- prosztata;
- ondóhólyagok a koaguláló mirigyekkel és váladékukkal, valamint a prosztata (egy egységként);
- agy, máj, vese, lép, agyalapi mirigy, pajzsmirigy és mellékvese, valamint az ismert célszervek.

Meg kell határozni a boncolásra kiválasztott F1 és F2 kölykök végső testtömegét. Az egyetlen véletlenszerűen kiválasztott kölyök/ivar/alom (lásd 1.5.6. szakasz) esetében az alábbi szervek tömegét kell megmérni: agy, lép és csecsemőmirigy.

Ha megoldható, a makroszkópos boncolási eredményeket és a szervtömeg-adatokat a más ismételt dózisu vizsgálatokban tett megfigyelésekkel összefüggésben kell értékelni.

1.5.8. Kórszövettan

1.5.8.1. A szülőállatok

A szülőállatokban (P és F1) a következő szerveket és szöveteiket vagy az ezekből készített reprezentatív mintákat fixálni kell a kórszövettani vizsgálatokhoz, majd megfelelő közegben el kell tárolni:

- hüvely, méh és méhnyak, valamint petefészkek (megfelelő rögzítőszerrel fixálva);
- egy here (Bouin-féle vagy hasonló rögzítőszerben tartósítva), egy mellékhere, ondóhólyagok, prosztata, és koaguláló mirigy;
- a pároztatásra kiválasztott összes P és F1 állatból származó, korábban meghatározott célszerv(ek).

Minden kontroll- és nagy dózissal kezelt csoportban el kell végezni a pároztatásra kiválasztott P és F1 állatok fent felsorolt és konzervált szerveinek és szöveteinek teljes körű kórszövettani vizsgálatát. A P állatok petefészkeinek vizsgálata nem kötelező. A NOAEL meghatározásának elősegítése érdekében a kezeléssel összefüggő változásokat mutató szerveket az alacsony és közepes dózissal kezelt csoportokban is meg kell vizsgálni. El kell végezni továbbá azon alacsony és közepes dózissal kezelt állatok szaporítószerveinek kórszövettani vizsgálatát, amelyek gyaníthatóan csökkent termékenységgel bírnak, így például azok esetében, amelyek nem tudtak párzani, megfoganni, utódokat nemzeni vagy egészséges utódokat a világra hozni, vagy amelyeknél az ivari ciklusra vagy a spermaszámra, spermamotilitásra vagy spermamorfológiára gyakorolt hatásokat észleltek. Minden makroszkópos léziót, így például atrofíát vagy daganatot is meg kell vizsgálni.

A kezeléssel összefüggő hatások, így például a visszatartott spermatidák, hiányzó csírasejtrétegek vagy típusok, sokmagvú óriássejtek, vagy a spermaképző sejtek leválása és lumenbe kerülésének azonosítása érdekében el kell végezni a here részletes kórszövettani vizsgálatát (pl. Bouin-féle rögzítőszer, paraffinba ágyazás és 4–5 µm vastag harántmetszetek) (14). Az ép mellékhere vizsgálatának ki kell terjednie a mellékhere feji részére, testére és farki részére, amelyet egy hosszanti metszet értékelésével lehet elvégezni. A mellékherében meg kell vizsgálni a leukocita infiltrációt, a sejtípusok gyakoriságában bekövetkező változásokat, az abnormális sejtípusokat, valamint az ondósejtek fagocitózisát. A hím szaporítószervek vizsgálatára PAS- és hematoxin-festés alkalmazható.

A szoptatási időszak után a petefészkeknek tüszőkezdeményeket és növekvő tüszőket kell tartalmaznia, valamint egy nagy méretű laktációs sárgatestet. A kórszövettani vizsgálat során meg kell vizsgálni a tüszőkezdemény-állomány kvalitatív deplécióját. Az F1 nőtények esetében el kell végezni a tüszőkezdemények kvantitatív értékelését is; az állatok számának, a kiválasztott petefészkmetszeteknek és metszetmintáknak az alkalmazott értékelési eljáráshoz statisztikai szempontból adekvátnak kell lennie. A kezelt és kontrollpetefészkek összehasonlításához a vizsgálatoknak ki kell terjedniük a tüszőkezdemények összeszámlálására, amelyekhez hozzá lehet venni a kis növekvő tüszőket is (15) (16) (17) (18) (19).

1.5.8.2. Az elválasztott állatok

A külső rendellenességeket vagy klinikai tüneteket mutató összes kölyök, valamint az F1 és az F2 generációból az egy véletlenszerűen kiválasztott és pároztatásra ki nem jelölt kölyök/ivar/alom makroszkóposan rendellenes szöveteit és célszerveit fixálni kell, majd megfelelő közegben el kell ezeket tárolni a kórszövettani vizsgálatokhoz. A konzervált szövetek teljes kórszövettani vizsgálatát úgy kell elvégezni, hogy külön hangsúlyt kell fektetni a szaporítószervekre.

2. ADATOK

2.1. Az eredmények kezelése

Az adatokat egyedileg kell a jelentésben rögzíteni, majd táblázatos formában is össze kell foglalni, amelyben minden egyes vizsgálati csoport és generáció esetében fel kell tüntetni az állatok számát a vizsgálat kezdetén, a vizsgálat során elpusztult vagy humánus okok miatt exterminált állatok számát, az elhullások és humánus okok miatti exterminálások

időpontját, a termékeny állatok számát, a vemhes nőtények számát, a toxicitás jeleit mutató állatok számát, a megfigyelt toxicitási tünetek leírását, ezen belül bármely toxikus tünet megjelenésének időpontját, valamint ezek időtartamát és súlyosságát, a szülőkkel és az utódokkal kapcsolatos megfigyelések típusait, a kórszövettani változások típusait és az almokra vonatkozó minden idevágó adatot.

A számszerű eredményeket megfelelő, általánosan elfogadott statisztikai módszerrel kell kiértékelni; a statisztikai módszereket a vizsgálat megtervezésének keretében kell kiválasztani, és meg is kell azt indokolni. Az adatok elemzéséhez célszerű lehet dózis-válasz statisztikai modelleket alkalmazni. A jelentésnek elegendő információt kell tartalmaznia az alkalmazott elemzési módszerrel és számítógépes programmal kapcsolatban ahhoz, hogy egy független bíráló vagy statisztikus újra tudja értékelni vagy rekonstruálni tudja az elemzést.

2.2. Az eredmények értékelése

A kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat eredményeit a megfigyelt hatások, ezen belül a boncolási és mikroszkópos eredmények szempontjából kell értékelni. Az értékelés során ki kell térni a vizsgálandó anyag dózisa és a rendelkezések, ezen belül a makroszkópos léziók, az azonosított célszervek, a csökkent termékenység, a klinikai rendelkezések, a csökkent reprodukció teljesítmény vagy alomszám, a testtömeg-változások, a mortalitásra gyakorolt hatások és egyéb toxikus hatások megléte vagy hiánya, illetve gyakorisága és súlyossága közötti összefüggésekre vagy ezek hiányára. A vizsgálati eredmények értékelésekor figyelembe kell venni a vizsgálandó anyag fizikai-kémiai tulajdonságait és az esetlegesen rendelkezésre álló toxikokinetikai adatokat is.

Egy megfelelően elvégzett reprodukciós toxicitási vizsgálat alapján kielégítő becslés tehető a hatást nem okozó szintre vonatkozóan, és megismerhetők a reprodukcióra, ellésre, szoptatásra, posztnatális fejlődésre, ezen belül a növekedésre és szexuális fejlődésre gyakorolt hatások.

2.3. Az eredmények értelmezése

A kétgenerációs reprodukciós toxicitási vizsgálat információkkal szolgál valamely anyagnak a szaporodási ciklus összes fázisában történő, ismételt expozíciója hatásairól. A vizsgálat különösen a reprodukció paramétereivel, valamint az utódok fejlődésével, növekedésével, érésével és túlélésével kapcsolatban ad információkat. A vizsgálat eredményeit a szubkrónikus, prenatális fejlődési, toxikokinetikai és egyéb vizsgálatok eredményeivel összefüggésben kell értelmezni. A vizsgálat eredményeit fel lehet használni annak felmérésére is, hogy szükség van-e egy vegyület további vizsgálatára. A vizsgálat eredményeinek emberre történő extrapolálása csak korlátozott mértékben érvényes. A vizsgálat leginkább arra alkalmazható, hogy információt nyerjünk a hatást nem okozó szintekkel és megengedhető humán expozícióval kapcsolatban (20) (21) (22) (23).

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

- fizikai jelleg és ahol fontos, fizikai-kémiai tulajdonságok;
- azonosító adatok;
- tisztaság.

Vivőanyag (ha szükséges):

- ha a vivőanyag nem víz, akkor ennek indoklása.

Kísérleti állatok:

- a felhasznált faj/törzs;
- az állatok száma, életkora és ivara;
- származás, tartási körülmények, takarmány, fészekrakó anyagok stb.;
- az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetén.

Kísérleti körülmények:

- a dózisszintek megválasztásának indoklása;
- a vizsgálandó anyag formulázásával/ a táplálék előkészítésével, az elért koncentrációval kapcsolatos információk;
- a készítmény stabilitása és homogenitása;
- a vizsgálandó anyag adagolására vonatkozó adatok;
- adott esetben a vizsgálandó anyag táplálékban/ivóvízben lévő koncentrációjának (ppm) átszámítása a tényleges dózisra (mg/testtömeg-kg/nap);
- a táplálék és az ivóvíz minőségével kapcsolatos információk.

Eredmények:

- táplálékfogyasztási és – ha van – vízfogyasztási adatok, táplálékhasznosítási képesség (egy gramm elfogyasztott táplálékra számított testtömeg-növekedés), és vizsgálandó anyag felvétele a P és F1 állatok esetében, kivéve az együttes tartás időszakát és legalább a szoptatási időszak utolsó harmadát;
- felszívódási adatok (ha vannak);
- a pároztatásra kiválasztott P és F1 állatok testtömeg-adatai;
- az almok és a kölykök testtömeg-adatai;
- a testtömeg az extermináláskor, valamint a szülői generáció abszolút és relatív szervtömeg-adatai;
- a klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (visszafordíthatóság);
- a vizsgálat során bekövetkező elhullás időpontja, illetve hogy az állatok életben maradtak-e az exterminálásig;
- toxikus válaszadatok ivaronként és dózisonként, ezen belül a párzás, a termékenység, a vemhesség, a születés, az életképesség és a szoptatás mérőszámai; a jelentésben fel kell tüntetni a mérőszámok kiszámításához felhasznált adatokat;
- a szaporodásra, az utódokra, a posztnatális növekedésre stb. gyakorolt toxikus vagy egyéb hatások;
- boncolási eredmények;
- az összes kórszövettani lelet részletes ismertetése;
- a szabályos ciklust mutató P és F1 nőstények száma, és a ciklusok időtartama;
- teljes ondósejtszám a mellékhere farki részében, az előrehaladó mozgást végző ondósejtek százalékos aránya, morfológiailag normál ondósejtek százalékos aránya és az azonosított rendellenességet mutató ondósejtek százalékos aránya;
- a pároztatás időtartama, ezen belül a párzásig eltelt napok száma;
- a vemhesség időtartama;
- a beágyazódások és sárgatestek száma, az almok mérete;
- az élveszületések száma és a beágyazódás utáni veszteség;
- a makroszkóposan látható rendellenességeket mutató kölykök száma, és ha meghatározták, akkor a csökkent utódok számát is fel kell tüntetni a jelentésben;
- a kölykökben meghatározott fizikai tájékozódási pontokkal kapcsolatos adatok és más posztnatális fejlődési adatok; a kiértékelt fizikai tájékozódási pontokat meg is kell indokolni;
- adott esetben a kölykökben és felnőtt állatokban végzett funkcionális megfigyelésekkel kapcsolatos adatok;
- adott esetben az eredmények statisztikai elemzése.

Az eredmények diszkussziója.

Következtetések, ezen belül az anyai és utódhatásokra vonatkozó NOAEL-értékek.

4. HIVATKOZÁSOK

- (1) Sadleir, R.M.F.S. (1979). Cycles and Seasons, In: Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, C.R. Auston and R.V. Short (eds.), Cambridge, New York.
- (2) Gray, L.E. et al., (1989). A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat. *Fundamental and Applied Toxicology* 12:92–108.
- (3) Robb, G.W. et al., (1978). Daily Sperm Production and Epididymal Sperm Reserves of Pubertal and Adult Rats. *Journal of Reproduction and Fertility* 54:103–107.
- (4) Klinefelter, G.R. et al., (1991). The Method of Sperm Collection Significantly Influences Sperm Motion Parameters Following Ethane Dimethanesulfonate Administration in the Rat. *Reproductive Toxicology* 5:39–44.
- (5) Seed, J. et al. (1996). Methods for Assessing Sperm Motility, Morphology, and Counts in the Rat, Rabbit, and Dog: a Consensus Report. *Reproductive Toxicology* 10(3):237–244.
- (6) Chapin, R.E. et al., (1992). Methods for Assessing Rat Sperm Motility. *Reproductive Toxicology* 6:267–273.
- (7) Klinefelter, G.R. et al., (1992). Direct Effects of Ethane Dimethanesulphonate on Epididymal Function in Adult Rats: an In Vitro Demonstration. *Journal of Andrology* 13:409–421.
- (8) Slott, V.L. et al., (1991). Rat Sperm Motility Analysis: Methodologic Considerations. *Reproductive Toxicology* 5:449–458.
- (9) Slott, V.L. and Perreault, S.D., (1993). Computer-Assisted Sperm Analysis of Rodent Epididymal Sperm Motility Using the Hamilton-Thorn Motility Analyzer. In: *Methods in Toxicology, Part A.*, Academic, Orlando, Florida. pp. 319–333.
- (10) Toth, G.P. et al. (1989). The Automated Analysis of Rat Sperm Motility Following Subchronic Epichlorhydrin Administration: Methodologic and Statistical Considerations. *Journal of Andrology* 10: 401–415.
- (11) Working, P.K. and M. Hurtt, (1987). Computerized Videomicrographic Analysis of Rat Sperm Motility. *Journal of Andrology* 8:330–337.

- (12) Linder, R.E. et al., (1992). Endpoints of Spermatotoxicity in the Rat After Short Duration Exposures to Fourteen Reproductive Toxicants. *Reproductive Toxicology* 6:491–505.
- (13) Korenbrot, C.C. et al., (1977). Preputial Separation as an External Sign of Pubertal Development in the Male Rat. *Biological Reproduction* 17:298–303.
- (14) Russell, L.D. et al., (1990). *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*, Cache River Press, Clearwater, Florida.
- (15) Heindel, J.J. and R.E. Chapin, (eds.) (1993). Part B. Female Reproductive Systems, *Methods in Toxicology*, Academic, Orlando, Florida.
- (16) Heindel, J.J. et al., (1989) Histological Assessment of Ovarian Follicle Number in Mice As a Screen of Ovarian Toxicity. In: *Growth Factors and the Ovary*, A.N. Hirshfield (ed.), Plenum, New York, pp. 421–426.
- (17) Manson, J.M. and Y.J. Kang, (1989). Test Methods for Assessing Female Reproductive and Developmental Toxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven, New York.
- (18) Smith, B.J. et al., (1991). Comparison of Random and Serial Sections in Assessment of Ovarian Toxicity. *Reproductive Toxicology* 5:379–383.
- (19) Heindel, J.J. (1999). Oocyte Quantitation and Ovarian Histology. In: *An Evaluation and Interpretation of Reproductive Endpoints for Human Health Risk Assessment*, G. Daston, and C.A. Kimmel, (eds.), ILSI Press, Washington, DC.
- (20) Thomas, J. A. (1991). Toxic Responses of the Reproductive System. In: *Casarett and Doull's Toxicology*, M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen (eds.), Pergamon, New York.
- (21) Zenick, H. and E.D. Clegg, (1989). Assessment of Male Reproductive Toxicity: A Risk Assessment Approach. In: *Principles and Methods of Toxicology*, A.W. Hayes (ed.), Raven Press, New York.
- (22) Palmer, A.K. (1981). In: *Developmental Toxicology*, Kimmel, C.A. and J. Buelke-Sam (eds.), Raven Press, New York.
- (23) Palmer, A.K. (1978). In *Handbook of Teratology*, Vol. 4, J.G. Wilson and F.C. Fraser (eds.), Plenum Press, New York.

8. számú melléklet az 56/2005. (XI. 29.) EüM–KvVM–BM együttes rendelethez

B.42. BŐRSZENZIBILIZÁCIÓ: LOKÁLIS NYIROKCSOMÓ-VIZSGÁLATI MÓDSZER

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer egyenértékű az OECD TG 429 (2002) módszerrel.

1.1. Bevezetés

A lokális nyirokcsomó-vizsgálati módszer (Local Lymph Node Assay, LLNA) kellőképpen validált és elfogadott ahhoz, hogy indokolt legyen új módszerként való elfogadása (1) (2) (3). Ez a második olyan módszer, amellyel állatokban vizsgálható a vegyületek bőrszenzibilizáló potenciálja. A másik módszer (B.6.) tengerimalacon végzett vizsgálatokat alkalmaz, konkrétan a tengerimalac-maximizációs módszert és a Bühler-vizsgálatot (4).

Az LLNA alternatív módszert jelent a bőrszenzibilizáló vegyületek meghatározására és annak igazolására, hogy egy vegyületnek nincs szignifikáns bőrszenzibilizáló potenciálja. Ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy minden esetben az LLNA-t kell alkalmazni a tengerimalac-vizsgálat helyett, hanem inkább azt, hogy ez a vizsgálati módszer éppolyan hasznos, és olyan alternatívaként alkalmazható, ahol mind pozitív, mind negatív eredmény esetén általában nincsen szükség ezek további megerősítésére.

Az LLNA mind a tudományos fejlődés, mind pedig az állatok kímélete szempontjából jár bizonyos előnyökkel. Ez a módszer a bőrszenzibilizáció indukciós fázisát vizsgálja és a dózis-válasz vizsgálatokhoz alkalmazható kvantitatív adatokat szolgáltat. Az LLNA validálására vonatkozó információk és az ezzel kapcsolatos munka áttekintése az (5) (6) (7) és (8) hivatkozásban található. Meg kell jegyezni továbbá, hogy azok az enyhén/közepesen szenzibilizáló anyagok, amelyeket pozitív kontrollként ajánlanak a tengerimalac-vizsgálati módszerekhez, az LLNA-nál is alkalmazhatók (6) (8) (9).

Az LLNA *in vivo* módszer, ennek következtében nem szünteti meg az állatok felhasználását a kontakt szenzibilizáló aktivitás vizsgálata során, de lehetővé teszi az erre a célra szükséges állatok számának csökkentését. Az LLNA emellett lehetővé teszi annak az eljárásnak a jelentős finomítását, amelynek során az állatokat a kontakt szenzibilizációs vizsgálathoz használják. Az LLNA azon immunológiai történések figyelmes vizsgálatán alapul, amelyeket a vegyület a szenzibilizáció indukciós fázisában stimulál. A tengerimalac-vizsgálattól eltérően az LLNA-hoz nincs szükség indukált

bőr-hiperszenzitivitási reakciók előidézésére. A tengerimalac-maximizációs vizsgálattal ellentétben nincs szükség adjuváns alkalmazására sem. Az LLNA alkalmazásával tehát csökkenthető az állatokat érő stressz mértéke. Az LLNA-nak a hagyományos tengerimalac-vizsgálatokkal szembeni előnyei ellenére el kell ismerni, hogy a módszernek vannak olyan korlátai (pl. hamis negatív eredmények egyes fémeknél vagy hamis pozitív eredmények bizonyos bőrirritáló anyagoknál) (10), amelyek szükségessé teszik a hagyományos tengerimalac-vizsgálatok alkalmazását.

Lásd még a Bevezetés B. részét.

1.2. A vizsgálati módszer elve

Az LLNA hátterében az az alapelv áll, hogy a szenzibilizáló anyagok elsődleges limfocita-proliferációt indukálnak abban a nyirokcsomóban, amely a vegyszer kijuttatásának helyéül szolgáló terület nyirokelvezetéséről gondoskodik. Ez a proliferáció arányos az alkalmazott dózis nagyságával (valamint az allergén erősségével), és egyszerű módszert biztosít a szenzibilizáció objektív és kvantitatív méréséhez. Az LLNA dózis-válasz összefüggésként méri ezt a proliferációt, ahol is a vizsgálati csoportokban mért proliferációt a vivőanyaggal kezelt csoportban mérttel hasonlítják össze. Meghatározzák a kezelt csoportokban a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportokban mérthez viszonyított proliferáció arányát, más néven a stimulációs indexet, amelynek legalább háromnak kell lennie ahhoz, hogy a vizsgálandó anyagot mint potenciális bőrszenzibilizálót további vizsgálatoknak vessék alá. Az itt ismertetett módszerek alapját a sejtproliferáció radioaktív jelöléssel történő mérése képezi. Azonban más végpontok is alkalmazhatók a proliferáció vizsgálatára, feltéve, hogy azt megfelelően megindokoljuk és tudományosan is alátámasztjuk, ezen belül teljeskörűen megadjuk a hivatkozásokot és a módszer leírását is.

1.3. A vizsgálati módszer ismertetése

1.3.1. Készítmények

1.3.1.1. Az állatok tartásának és etetésének körülményei

Az állatokat egyedileg kell tartani. A kísérleti helyiség hőmérsékletének 22 °C (± 3 °C)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30%-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70%-ot, a célértékek 50 és 60% között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett.

1.3.1.2. Az állatok előkészítése

Az állatokat véletlenszerűen kell kiválasztani, majd egyedi azonosítóval kell ellátni (de nem valamilyen füljelzővel), és a kezelés megkezdése előtt legalább 5 napig a ketrecükben kell tartani őket, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez. A kezelés megkezdése előtt minden állatot meg kell vizsgálni, és ellenőrizni kell, hogy nincsenek-e rajtuk látható bőrsérülések.

1.3.2. Kísérleti körülmények

1.3.2.1. Kísérleti állatok

Ehhez a vizsgálathoz egeret kell használni. Fiatal, felnőtt, a CBA/Ca vagy a CBA/J törzsből származó nőtény egereket kell használni, amelyek még egyszer sem ellettek és nem is vemhesek. A vizsgálat kezdetén az állatoknak 8–12 hetesnek kell lenniük, minimális testtömegbeli eltéréssel, amely nem haladhatja meg a testtömeg-átlag 20%-át. Ha elegendő adat áll rendelkezésre arra nézve, hogy nincsenek szignifikáns törzs- és/vagy ivarspecifikus különbségek az LLNA-válasz tekintetében, más törzsek, illetve him állatok is alkalmazhatók.

1.3.2.2. A megbízhatóság ellenőrzése

A vizsgálat megfelelő módon történő elvégzésének igazolására, illetve a laboratórium ez irányú kompetenciájának demonstrálására pozitív kontrollokat kell alkalmazni. A pozitív kontrollnak pozitív LLNA-választ kell kiváltania egy olyan expozíciós szint mellett, amelynél a negatív kontrollhoz viszonyítva várhatóan 3-nál magasabb stimulációs index (SI) érhető el. A pozitív kontroll dózist úgy kell megválasztani, hogy az indukció egyértelmű legyen, de ne eltúlzott. Erre a célra előnyös anyagok a hexil-cinnamaldehyd (CAS-szám: 101–86–0, EINECS-szám: 202–983–3) és a merkaptobenzotiazol (CAS-szám: 149–30–4, EINECS-szám: 205–736–8). Olyan körülmények is lehetségesek, amikor a fenti kritériumoknak megfelelő más kontrollanyag is alkalmazható, feltéve, hogy azt megfelelően megindokolják. Míg rendes körülmények között minden egyes vizsgálathoz szükség lehet egy pozitív kontrollcsoportra, esetenként a vizsgáló laboratóriumoknak elegendő korábbi pozitív kontrolladat áll rendelkezésére ahhoz, hogy egy hat hónapos vagy még hosszabb időszakra vonatkozóan be tudják mutatni a megfelelő válaszreakció következetes megjelenését. Ilyen esetekben ritkábban, de legalább 6 havonta lehet szükség pozitív kontrollok alkalmazására. Bár a pozitív kontrollanyagot olyan vivőanyagban kell vizsgálni, amelyről ismeretes, hogy következetes választ idéz elő (pl. aceton-olívaolaj elegy), előfordulhat, hogy hatósági előírások miatt egy nem standard vivőanyagot is alkalmazni kell (amelynek összetétele klinikai/kémiai szempontból fontos). Ilyen esetekben a pozitív kontroll- és e nem konvencionális vivőanyag közötti lehetséges kölcsönhatást is meg kell vizsgálni.

1.3.2.3. Az állatok száma, a dózisszintek és a vivőanyag megválasztása

Minden dóziscsoportban legalább négy állatot kell alkalmazni, és a vizsgálandó anyagból legalább három különböző koncentrációt, továbbá egy negatív kontrollcsoportot, amelyet csak a vizsgálandó anyaghoz használt vivőanyaggal kezelnek, valamint adott esetben egy pozitív kontrollt is. Azokban az esetekben, amikor egyedileg kell gyűjteni az állatok adatait, dóziscsoportonként legalább öt állatot kell alkalmazni. Attól eltekintve, hogy vizsgálandó anyagot nem kapnak az állatok, a kontrollcsoportokban lévő állatokat ugyanúgy kell kezelni, mint a kezelt csoportokban lévőket.

A dózisokat és a vivőanyagot az (1) hivatkozásban található ajánlások alapján kell megválasztani. A dózisokat a 100%, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5%, 1%, 0,5% stb. koncentrációsorozatról kell kiválasztani. A három egymás utáni koncentráció megválasztásakor figyelembe kell venni az esetlegesen rendelkezésre álló akut toxicitási és bőrirritációs adatokat is, hogy a legmagasabb koncentráció maximális expozíciót okozzon, de ne jelentkezzen szisztémás toxicitás vagy túlzott mértékű lokális bőrirritáció (2) (11).

A vivőanyagot aszerint kell kiválasztani, hogy maximális legyen a vizsgálandó anyag koncentrációja és oldhatósága, miközben a vizsgálandó anyag alkalmazásához megfelelő oldat/szuszpenzió álljon rendelkezésre. Az ajánlott vivőanyagok a preferencia sorrendjében a következők: aceton/olívaolaj (4:1 térfogatarány), dimetilformamid, metil-etil-keton, propilén-glikol és dimetil-szulfoxid (2) (10), de megfelelő tudományos indoklás esetén más vivőanyagok is alkalmazhatók. Bizonyos esetekben szükség lehet arra, hogy további kontrollként egy klinikai szempontból lényeges vivőanyagot használjanak, vagy azt a kereskedelmi formulát, amelyben a vizsgálandó anyagot forgalomba hozzák. Különösen vigyázni kell arra, hogy a hidrofíl anyagokat olyan vivőanyagrendszerbe építsék be, amely nedvesíti a bőrt és nem fut le azonnal. Kerülni kell tehát a teljesen vizes vivőanyagokat.

1.3.3. Vizsgálati eljárás

1.3.3.1. A kísérleti program

A vizsgálathoz az alábbi kísérleti programot kell alkalmazni:

– 1. nap:

Határozzuk meg és jegyezzük fel minden egyes állat testtömegét. Vigyünk fel 25 µl térfogatú megfelelő hígítású vizsgálandó anyagot, valamint a vivőanyagot önmagában vagy (adott esetben) pozitív kontrollt a fülek dorzális oldalára.

– 2. és 3. nap:

Ismételjük meg az 1. napon elvégzett felviteli eljárást.

– 4. és 5. nap:

Nincs kezelés.

– 6. nap:

Mérjük meg és jegyezzük fel az állatok testtömegét. Injekciózunk 250 µl, 20 µCi (7,4 e + 8 Bq) ³H-metil-timidint tartalmazó sós foszfátpuffert (PBS) a kezelt és kontrollegerek farokvénájába. Használhatunk ehelyett 250 µl, 2 µCi (7,4 e + 7 Bq) ¹²⁵I-jóddeoxiuridint és 10⁻⁵ M fluorodeoxiuridint tartalmazó PBS-t is, szintén az egerek farokvénájába injektálva.

Öt órával később extermináljuk az állatokat. Mindegyik kísérleti csoportban az állatok füléből vágjuk ki a kezelt terület nyirokvezetéséről gondoskodó füli nyirokcsomókat és tegyük be azokat kísérleti csoportonként egy PBS-t tartalmazó edénybe (összevonat kezelési csoporton alapuló megközelítés). Más esetben úgy is eljárhatunk, hogy csak az egyes állatokból kivágott nyirokcsomó-párokat tesszük egy-egy PBS-t tartalmazó edénybe (egyedi megközelítés). A nyirokcsomók meghatározásának és kipreparálásának részleteit és az ehhez kapcsolódó diagrammokat a (10) hivatkozás I. mellékletében találhatjuk meg.

1.3.3.2. A sejtszuszenziók elkészítése

Az összevonat kezelési csoportokból származó vagy az egyes állatokból két oldalról vett nyirokcsomósejtekből (LNC) álló egysejt-szuszenziókat kell előállítani 200 µm-es lyukméretű, rozsdamentes acélból készült fémhálón keresztül történő óvatos mechanikai dezintegrálással. A nyirokcsomósejteket nagy feleslegben lévő PBS-sel kétszer át kell mosni, majd 4 °C-on 18 órán át, 5%-os triklórecetsavval (TCA) precipitálni (2). A pelleteket vagy 1 ml TCA-ban újra kell szuszpendálni és 10 ml szcintillációs folyadékot tartalmazó szcintillációs fiolákba (³H-számlálás) áttenni, vagy közvetlenül gammaszámláló csövekbe (¹²⁵I-számlálás) kell átrakni.

1.3.3.3. A sejtprolifерáció meghatározása (beépült radioaktivitás)

A ³H-metil-timidin beépülését β-szcintillációs számlálással mérik, percenkénti bomlás (DPM) egységekben. A ¹²⁵I-jóddeoxiuridin beépülését ¹²⁵I-számlálással mérik, és ugyancsak DPM-ben fejezik ki. Az alkalmazott megközelítéstől függően a beépülést DPM/kezelési csoport (összevonat megközelítés) vagy DPM/állat (egyedi megközelítés) egységben fejezik ki.

1.3.3.4. Megfigyelések

1.3.3.4.1. Klinikai megfigyelések

Naponta egyszer gondosan meg kell vizsgálni az állatokban az alkalmazás helyén kialakuló lokális irritáció vagy szisztémás toxicitás esetleges klinikai tüneteit. Minden megfigyelést szisztematikusan fel kell jegyezni, minden egyes állat esetében egyedi adatsor felvételével.

1.3.3.4.2. Testtömeg

Ahogy az az 1.3.3.1. szakaszban szerepel, az egyes állatok testtömegét a vizsgálat kezdetén, illetve az exterminálás tervezett időpontjában kell megmérni.

1.3.4. Az eredmények kiszámítása

Az eredményeket a stimulációs indexben (SI) fejezik ki. Az összevont megközelítés alkalmazása esetén az SI-t úgy kapják meg, hogy az egyes kezelési csoportokra eső összevont radioaktív beépülést elosztják a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportra jutó összevont beépüléssel. Ennek eredményeként egy átlagos SI-érték kapnak. Az egyedi megközelítés alkalmazása esetén az SI-t úgy kapják meg, hogy minden egyes kezelt csoport és a pozitív kontrollcsoport átlagos DPM/állat-értékét elosztják az oldószerrel/vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport átlagos DPM/állat értékével. A vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportok átlagos SI-értéke tehát 1.

Ha az SI számítására az egyedi megközelítést alkalmazzuk, akkor statisztikai elemzések is végezhetők az adatokon. A megfelelő statisztikai elemzési módszer kiválasztásakor a vizsgálónak figyelemmel kell lennie a lehetséges variancia-egyenlőtlenségekre és más kapcsolódó problémákra, ami miatt adat-transzformációra vagy nem paraméteres statisztikai elemzésre lehet szükség. Az adatok értelmezéséhez adekvát megközelítés, ha a kezelt és vivőanyaggal kezelt kontrollállatok minden egyes adatát külön értékelik ki, majd ezekből a konfidenciahatárok figyelembevételével levezetik a legjobban illeszkedő dózis-válasz görbét (8) (12) (13). A vizsgálónak azonban fel kell készülnie arra, hogy egy adott csoportban egy-egy állat válasza »kilóghat a sorból«, ami miatt más módon (pl. átlag helyett medián alkalmazásával) kell a választ mérni, vagy ki kell zárni a kilógó adatokat az elemzésből.

A választ akkor lehet pozitívként értékelni, ha – a dózis-válasz összefüggést és adott esetben a statisztikai szignifikanciát is figyelembe véve – a stimulációs index 3 (3) (6) (8) (12) (14).

Ha a kapott eredmények tisztázást igényelnek, figyelembe kell venni a vizsgálandó anyag különféle tulajdonságait, és ezen belül azt is, hogy mutat-e szerkezeti rokonságot ismert bőrszenzibilizáló anyagokkal, okoz-e erőteljes bőrirritációt, illetve hogy milyen a megfigyelt dózis-válasz összefüggés. Ezek, illetve a további megfontolások részletesebb tárgyalását lásd a (7) hivatkozásban.

2. ADATOK

Az adatokat táblázatos formában kell összefoglalni, amely minden dóziscsoportra (ezen belül a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoportra vonatkozóan is) mutatja az átlagos és egyedi DPM-értékeket és stimulációs indexeket.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

- azonosító adatok (pl. adott esetben a CAS-szám; továbbá eredet; tisztaság; ismert szennyezők; tételszám);
- fizikai megjelenés és fizikai-kémiai tulajdonságok (pl. illékonyság, oldhatóság, stabilitás);
- elegy esetén annak összetétele és az egyes komponensek egymáshoz viszonyított aránya.

Vivőanyag:

- azonosító adatok [tisztaság; (adott esetben) koncentráció; alkalmazott térfogat]
- a vivőanyag megválasztásának indoklása.

Kísérleti állatok:

- a felhasznált egértörzs;
- az állatok mikrobiológiai státusa, feltéve, hogy ismert;
- az állatok származása, tartásának körülményei, takarmánya stb.;
- az állatok száma, életkora és ivara;

kísérleti körülmények:

- a vizsgálandó anyagból előállított készítménnyel és annak alkalmazásával kapcsolatos adatok;
- a dózisszintek megválasztásának indoklása, ezen belül adott esetben a tartománybehatároló vizsgálatok eredményei; a vivőanyag és a vizsgálandó anyag alkalmazott koncentrációja és az anyag teljes alkalmazott mennyisége;
- a táplálék és a víz minősége (ezen belül a takarmány típusa/forrása, a víz forrása).

A megbízhatóság ellenőrzése:

– a legutóbbi megbízhatósági ellenőrzés eredményeinek összefoglalása az alkalmazott anyag, koncentráció és vivőanyag adataival együtt;

– a vizsgáló laboratórium párhuzamos és/vagy korábbi pozitív és negatív kontrolladatai.

Eredmények:

– az egyes állatok testtömege a kezelés kezdetén és az exterminálás tervezett időpontjában;

– az átlagos (összevont megközelítés) és egyedi (állatonkénti megközelítés) DPM-értékek táblázata, illetve az egyes megközelítéseknél kapott értéktartományok és az egyes dóziscsoportok (ezen belül a vivőanyaggal kezelt kontrollcsoport) stimulációs indexei;

– adott esetben statisztikai elemzés;

– a toxicitási tünetek, ezen belül az alkalmazás helyén esetleg kialakuló bőrirritáció megjelenésének időpontja és időbeli alakulása minden egyes állatra vonatkozóan.

Az eredmények diszkussziója:

– Egy rövid kommentár az eredményekhez, a dózis-válasz elemzéshez és adott esetben a statisztikai elemzésekhez, a következtetés levonásával, amely szerint a vizsgálandó anyagot bőrszenzibilizálónak kell-e tekinteni vagy sem.

4. HIVATKOZÁSOK

(1) Kimber, I. and Basketter, D.A. (1992). The murine local lymph node assay; collaborative studies and new directions: A commentary. *Food and Chemical Toxicology* 30, 165–169.

(2) Kimber, I., Derman, R.J., Scholes E.W. and Basketter, D.A. (1994). The local lymph node assay: developments and applications. *Toxicology*, 93, 13–31.

(3) Kimber, I., Hilton, J., Dearman, R.J., Gerberick, G.F., Ryan, C.A., Basketter, D.A., Lea, L., House, R.V., Ladies, G.S., Loveless, S.E., Hastings, K.L. (1998). Assessment of the skin sensitisation potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory exercise. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 53, 563–79.

(4) B6. vizsgálati módszer.

(5) Chamberlain, M. and Basketter, D.A. (1996). The local lymph node assay: status of validation. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 999–1002.

(6) Basketter, D.A., Gerberick, G.F., Kimber, I. and Loveless, S.E (1996). The local lymph node assay- A viable alternative to currently accepted skin sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*, 34, 985–997.

(7) Basketter, D.A., Gerberick, G.F. and Kimber, I. (1998). Strategies for identifying false positive responses in predictive sensitisation tests. *Food and Chemical Toxicology*. 36, 327–33.

(8) Van Och, F.M.M, Slob, W., De Jong, W.H., Vandebriel, R.J., Van Loveren, H. (2000). A quantitative method for assessing the sensitising potency of low molecular weight chemicals using a local lymph node assay: employment of a regression method that includes determination of uncertainty margins. *Toxicology*, 146, 49–59.

(9) Dearman, R.J., Hilton, J., Evans, P., Harvey, P., Basketter, D.A. and Kimber, I. (1998). Temporal stability of local lymph node assay responses to hexyl cinnamic aldehyde. *Journal of Applied Toxicology*, 18, 281–4.

(10) National Institute of Environmental Health Sciences (1999). The Murine Local Lymph Node Assay: A Test Method for Assessing the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals/Compounds: The Results of an Independent Peer Review Evaluation Coordinated by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICETAM). NIH Publication No: 99–4494, Research Triangle Park, N.C. (<http://iccvam.niehs.nih.gov>).

(11) B4. vizsgálati módszer.

(12) Basketter, D.A., Selbie, E., Scholes, E.W. Lees, D. Kimber, I. and Botham, P.A. (1993) Results with OECD recommended positive control sensitisers in the maximisation, Buehler and local lymph node assays. *Food and Chemical Toxicology*, 31, 63–67.

(13) Basketter D.A., Lea L.J., Dickens A., Briggs D., Pate I., Dearman R.J., Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC₃ values from local lymph node assay dose responses. *J. Appl. Toxicology*, 19, 261–266.

(14) Basketter DA, Blaikie L, Derman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR and Rycroft RTG (2000). Use of local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42, 344–48.

B.43. NEUROTOXICITÁSI VIZSGÁLAT RÁGCSÁLÓKBAN

1. MÓDSZER

Ez a módszer egyenértékű az OECD TG 424 (1997) módszerrel.

Ennek a vizsgálati módszernek az a célja, hogy megkapjuk egy vegyület felnőtt állatokra gyakorolt neurotoxicitási potenciáljának igazolásához vagy további jellemzéséhez szükséges információkat. A vizsgálat végezhető más, az ismételt dózisu toxicitási vizsgálatokhoz alkalmazott ismert vizsgálati módszerekkel együtt vagy önálló vizsgálatként is. Az e módszeren alapuló vizsgálatok megtervezésekor ajánlatos az OECD Neurotoxicitási Vizsgálati Stratégiák és Módszerek Útmutóját (1) is igénybe venni. Ez különösen akkor fontos, ha fontolóra vesszük a megfigyelések és vizsgálati eljárások módosítását az e módszer rutinalkalmazásához ajánlottakhoz képest. Az útmutató azzal a céllal készült, hogy elősegítse a konkrét feltételek esetén alkalmazandó egyéb vizsgálati eljárások kiválasztását. Ez a módszer nem terjed ki a fejlődési neurotoxicitás tanulmányozására.

1.1. Bevezetés

A vegyületek toxikus jellemzőinek vizsgálatakor és értékelésekor fontos figyelembe venni a neurotoxikus hatások lehetőségét. Már az ismételt dózisu szisztémás toxicitási vizsgálati módszer is magában foglal olyan megfigyeléseket, amellyel a neurotoxicitás lehetőségét szűrik. Ez a vizsgálati módszer felhasználható olyan vizsgálatok tervezésére, amelyekkel további információk szerezhetők az ismételt dózisu szisztémás toxicitási vizsgálatokban megfigyelt neurotoxikus hatásokkal kapcsolatban, vagy megerősíthetők azokat. Azonban bizonyos vegyületcsoportok potenciális neurotoxicitásának mérlegelése azt sugallhatja, hogy e módszer alkalmasabb lehet ezek vizsgálatára anélkül, hogy ismételt dózisu szisztémás toxicitási vizsgálatok az adott anyag potenciális neurotoxicitását előre jeleznék. Ilyen megfontolások például a következők:

- neurológiai tünetek vagy neuropathológiai léziók észlelése az ismételt dózisu szisztémás toxicitási vizsgálatoktól eltérő toxicitási vizsgálatokban, vagy
- szerkezeti összefüggések vagy más információk, amelyek kapcsolatba hozzák az anyagot ismert neurotoxikus anyagokkal.

Előfordulhatnak továbbá más olyan esetek is, amikor ezt a módszert érdemes alkalmazni. A további részleteket lásd az (1) hivatkozásban.

E módszert úgy dolgozták ki, hogy annak megfelelő kiigazításával egy vegyület egyedi kórszövettani és viselkedési neurotoxicitásának igazolására vonatkozó sajátos elvárásoknak is megfeleljen, és tegye lehetővé a neurotoxikus válaszok jellemzését és számszerűsítését.

A neurotoxicitást korábban azonosnak tekintették az idegbántalmakkal (neuropátia), beleértve az idegkórtani bántalmakat vagy idegműködési zavarokat, így például rohamokat, bénulást vagy remegést. Bár az idegbántalmak a neurotoxicitás fontos megnyilvánulási formáit jelentik, ma már világos, hogy az idegrendszeri toxicitásnak számos olyan jele van (pl. a mozgáskoordináció csökkenése, érzékelési zavarok, tanulási és memóriazavarok), amelyek neuropátiás vagy más típusú vizsgálatokban esetleg nem jelennek meg.

E neurotoxicitási vizsgálati módszert úgy alakították ki, hogy alkalmas legyen a jelentősebb viselkedés-neurológiai és idegkórtani hatások felnőtt rágcsálókban történő kimutatására. Bár a viselkedésbeli hatások még morfológiai változások hiányában is tükrözhetik az élő szervezetekre gyakorolt káros hatásokat, nem minden viselkedésbeli változás specifikus az idegrendszerre. Így tehát minden megfigyelt változást az ezzel összefüggő kórszövettani, hematológiai vagy biokémiai adatokkal, valamint egyéb típusú szisztémás toxicitásra vonatkozó adatokkal összefüggésben kell értékelni. Az e módszerrel végzett és a neurotoxikus válaszok jellemzését, valamint számszerűsítését célzó vizsgálat specifikus kórszövettani és viselkedésvizsgálati eljárásokat is magában foglal, amelyek további elektrofiziológiai és/vagy biokémiai vizsgálatokkal is alátámaszthatók (1) (2) (3) (4).

A neurotoxikus anyagok egy sor célpontra hathatnak az idegrendszeren belül, és hatásmechanizmusuk is igen sokféle lehet. Mivel nem létezik egyetlen olyan vizsgálatosorozat sem, amelynek segítségével az összes anyag esetében meghatározható lenne a neurotoxikus potenciál, szükség lehet más, a megfigyelt vagy várt neurotoxicitás típusára specifikus *in vivo* vagy *in vitro* vizsgálatokra is.

Ez a vizsgálati módszer arra is felhasználható, hogy az OECD Neurotoxicitási Vizsgálati Stratégiák és Módszerek Útmutójában (1) megfogalmazott iránymutatással összefüggésben olyan vizsgálatokat is lehessen általa tervezni, amelyek célja, hogy általuk tovább lehessen jellemezni vagy növelni a dózis-válasz összefüggés számszerű meghatározásának érzékenységet annak érdekében, hogy jobban meg lehessen becsülni a nem észlelhető káros hatás szintjét, vagy igazolható legyen a vegyület ismert vagy feltételezett veszélyessége. Olyan vizsgálatok is tervezhetők például, amelyek segítségével meghatározható(k) vagy értékelhető(k) a neurotoxicitási mechanizmus(ok), vagy kiegészíthetők a rendelkezésre álló, alap viselkedés-neurológiai és neuropathológiai megfigyelési eljárások alkalmazásával kapott adatok. Az ilyen vizsgálatok esetében nem szükséges olyan adatok gyűjtését megismételni, amelyeket az e módszernél ajánlott stan-

dard eljárások alkalmazásával kapnának meg, ha az ilyen adatok már rendelkezésre állnak, és azokat nem tartják szükségesnek a vizsgálat eredményeinek értelmezéséhez.

Ez a neurotoxicitási vizsgálat – akár önállóan, akár más vizsgálatokhoz kapcsolódva végzik – olyan információkat szolgáltat, amelyek:

- meghatározhatják, hogy a vizsgálandó vegyület tartós vagy visszafordítható hatásokat gyakorolt-e az idegrendszerre;
- hozzájárulhatnak a kémiai vegyülettel történő expozícióval járó idegrendszeri elváltozások jellemzéséhez, illetve az ezek hátterében álló mechanizmusok megismeréséhez;
- meghatározhatják a dózis- és idő-válasz összefüggéseket a nem észlelhető káros hatás szint becsléséhez (amelyet a vegyület biztonsági kritériumainak megállapításához lehet felhasználni).

Ennél a vizsgálati módszernél a vizsgálandó anyagot orálisan adagolják. Más (pl. a dermális vagy inhalációs) beadási módok esetenként megfelelőbbek lehetnek, amelyek használata esetén szükség lehet a javasolt eljárások módosítására is. A beadási mód kiválasztásával kapcsolatos megfontolások a humán expozíciós profiltól és a rendelkezésre álló toxikológiai és kinetikai adatoktól függenek.

1.2. Fogalommeghatározások

»Káros hatás«: a normálhoz viszonyított bármilyen, a kezelés okozta elváltozás, amely csökkenti az élő szervezet túlélésre, szaporodásra vagy környezethez való alkalmazkodásra való képességét.

»Dózis«: a vizsgálandó anyag beadott mennyisége. A dózist tömegegységben (g, mg), vagy a vizsgálandó anyag tömegének és a vizsgált állat tömegegységének hányadosában (pl. mg/kg), vagy a táplálékban lévő állandó koncentrációban (ppm) fejezik ki.

»Adagolás«: általános meghatározás, amely a dózist, valamint az adagolás gyakoriságát és időtartamát foglalja magában.

»Neurotoxicitás«: az idegrendszer szerkezetét vagy működését érintő káros elváltozás, amelyet egy kémiai, biológiai vagy fizikai ágens jelentette expozíció idéz elő.

»Neurotoxikus anyag«: bármilyen kémiai, biológiai vagy fizikai ágens, amely neurotoxicitást tud okozni.

»NOAEL«: a nem észlelhető káros hatás szintjének (no-observed-adverse effect level) rövidítése, amely azt a legmagasabb dózisszintet jelöli, amelynél nem figyelhetők meg kezeléssel összefüggő káros hatások.

1.3. A vizsgálati módszer elve

A vizsgálandó vegyületet egy dózistartományon belül több dózisban adagolják orálisan laboratóriumi rágcsálók több csoportjának. Általában ismételt dózisokat kell alkalmazni, és az adagolási rend lehet 28 napos, szubkrónikus (90 napos) vagy krónikus (1 éves vagy annál hosszabb). Az ebben a vizsgálati módszerben leírt eljárások akut neurotoxicitási vizsgálatokhoz is felhasználhatók. Az állatokat olyan módon vizsgálják, hogy lehetőség legyen a viselkedési és/vagy neurológiai rendellenességek észlelésére vagy jellemzésére. Minden megfigyelési időszakban egy sor olyan viselkedést vizsgálnak meg, amelyre hatással lehetnek a neurotoxikus anyagok. A vizsgálat végén az összes csoportból és mindkét nemből kiválasztanak néhány állatot, amelyeknél *in situ* perfúziót végeznek, és amelyekből agyi, gerincvelői és perifériás idegi metszeteket készítenek és vizsgálnak meg.

Ha a vizsgálatot a neurotoxikus hatások megállapítását vagy jellemzését célzó önálló vizsgálatként végzik, a csoportokba tartozó, perfúzióra és ezt követő kórszövettani vizsgálatokra (lásd 1. táblázat) fel nem használt állatokat olyan specifikus viselkedés-neurológiai, neuropathológiai, neurokémiai vagy elektrofiziológiai eljárásokhoz lehet felhasználni, amelyek kiegészíthetik az e módszer szerint szükséges standard vizsgálatokkal kapott adatokat (1). E kiegészítő eljárások különösen akkor lehetnek hasznosak, ha empirikus megfigyelések vagy várható hatások a vegyület specifikus típusú vagy specifikus célterületre irányuló neurotoxicitását jelzik. Más esetben a fennmaradó állatok egyéb értékelések, így például a rágcsálókban végzett ismételt dózisú toxicitási vizsgálati módszerekben előírtak céljára alkalmazhatók.

Ha e vizsgálati módszer eljárásait más vizsgálati módszerek eljárásaival kombinálják, kellő számú állatra van szükség ahhoz, hogy mindkét vizsgálat megfigyelési igényei kielégíthetők legyenek.

1.4. A vizsgálati módszer ismertetése

1.4.1. Az állatfaj kiválasztása

A preferált rágcsálófaj a patkány, bár megfelelő indoklás esetén más rágcsálófajok is alkalmazhatók. Általánosan használt laboratóriumi törzsekből származó egészséges, fiatal felnőtt állatokat kell alkalmazni. Olyan nőstényeket kell választani, amelyek még egyszer sem ellettek és nem vemhesek. Az adagolást általában az elválasztás után a lehető leghamarabb meg kell kezdeni, lehetőleg még az állatok hathetes koráig, de mindenképpen az előtt, hogy elérnék a kilenc-hetes kort. Azonban ha a vizsgálatot más vizsgálatokkal kombinálják, a korra vonatkozó követelményeket esetleg ennek megfelelően módosítani kell. A vizsgálat kezdetén az alkalmazott állatok közötti testtömeg-eltérés nem haladhatja meg az egyes ivarok átlagának $\pm 20\%$ -át. Ha egy hosszú távú vizsgálat előtt előzetes vizsgálatként rövid időtartamú ismételt dózisú vizsgálatot végeznek, mindkét vizsgálatban azonos törzsből és forrásból származó állatokat kell használni.

1.4.2. Az állatok tartásának és etetésének körülményei

A kísérleti helyiség hőmérsékletének $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$)-nak kell lennie. Bár a helyiség relatív páratartalmának legalább 30%-nak kell lennie, illetve a takarítás időtartamától eltekintve lehetőleg ne haladja meg a 70%-ot, a javasolt átlagértéknek 50 és 60% között kell lennie. A világítás legyen mesterséges; 12 órás világos és 12 órás sötét periódusok váltsák egymást. Minimálisra kell csökkenteni az időszakosan jelentkező erős zajokat. Az etetéshez standard laboratóriumi takarmány alkalmazható, korlátlan mennyiségű ivóvíz biztosítása mellett. A takarmány megválasztását az is befolyásolhatja, hogy ha a vizsgálandó anyagot táplálékkal adják be, akkor az megfelelően keveredjen el az étellel. Az állatokat tartjuk egyedileg vagy azonos ivarú egyedekből álló kisebb csoportokban is.

1.4.3. Az állatok előkészítése

Az egészséges fiatal állatokat véletlenszerűen kell beosztani a kezelt és kontrollcsoportokba. A ketrecek úgy kell elrendezni, hogy minimálisra lehessen csökkenteni a ketrec elhelyezésének lehetséges hatásait. Az állatokat egyedi azonosítóval kell ellátni, és a vizsgálat megkezdése előtt legalább öt (5) napig a ketrecükben kell őket tartani, hogy hozzászokhassanak a laboratóriumi körülményekhez.

1.4.4. A beadási mód és a dózisok előkészítése

Ez a vizsgálati módszer konkrétan előírja a vizsgálandó anyag orális alkalmazását, amely történhet szondán keresztül, táplálék vagy ivóvíz útján vagy kapszulák beadásával. Más beadási módok (pl. dermális vagy inhalációs) is használhatók, de emiatt esetleg módosítani kell az ajánlott eljárásokat. A beadási mód megválasztása függ a humán expozíciós profiltól és a rendelkezésre álló toxikológiai vagy kinetikai információktól. A beadási mód megválasztását meg kell indokolni, továbbá meg kell jelölni az ebben a vizsgálati módszerben előírt eljárások emiatt szükségessé vált módosításait is.

Ha szükséges, a vizsgálandó anyagot megfelelő vivőanyagban fel lehet oldani vagy szuszpendálni. Elsősorban vizes oldatot/szuszpenziót ajánlatos alkalmazni, másodsorban olajos (pl. kukoricacsíra-olajban elkészített) oldatot vagy szuszpenziót, és csak harmadsorban más vivőanyagokban elkészített oldatot vagy szuszpenziót. Ismerni kell a vivőanyag toxikus jellemzőit. Emellett a vivőanyag következő jellemzőit kell figyelembe venni: a vizsgálandó anyag felszívódására, eloszlására, metabolizmusára és visszatartására gyakorolt hatások; a vizsgálandó anyag kémiai tulajdonságaira gyakorolt hatások, amelyek módosíthatják annak toxikus jellemzőit; valamint az állatok táplálék- és vízfogyasztására vagy tápláltsági állapotára gyakorolt hatások.

1.5. Eljárások

1.5.1. Az állatok száma és ivara

Ha a vizsgálatot önálló vizsgálatként végzik, legalább 20 állatot (10 nőtényt és 10 hímeket) kell alkalmazni minden egyes dózis- és kontrollcsoportban a részletes klinikai és funkcionális megfigyelések értékeléséhez. A 10 hím és 10 nőstény közül a vizsgálat végén legalább öt hímeket és öt nőtényt kell kiválasztani az *in situ* perfúzióhoz és a részletes ideg-kórszövettani vizsgálatokhoz. Ha az adott dóziscsoportban csak korlátozott számú állatnál lehet megfigyelni neurotoxikus hatásokat, fontolóra kell venni ezeknek az állatoknak is a perfúzióra kijelöltek közé való felvételét. Ha a vizsgálatot egy ismételt dózisos toxicitási vizsgálatnál egybekötve végzik, kellő számú állatot kell felhasználni ahhoz, hogy mindkét vizsgálat célkitűzéseit meg tudják valósítani. A vizsgálatok különböző kombinációi esetén szükséges minimális csoportméretek az 1. táblázat tartalmazza. Ha időközi exterminációkat vagy a toxikus hatások visszafordíthatóságának, tartósságának vagy kezelés utáni késleltetett megjelenésének megfigyelésére gyógyulási csoportokat vagy kiegészítő megfigyeléseket is terveznek, a kísérleti állatok számát úgy kell növelni, hogy elegendő számú állatot biztosíthassanak a megfigyelésekhez és kórszövettani vizsgálatokhoz.

1.5.2. A kezelt és kontrollcsoportok

Általában legalább három dóziscsoportot és egy kontrollcsoportot kell alkalmazni, de ha más adatok áttekintése alapján 1000 mg/testtömeg-kg/nap ismételt dózis alkalmazásakor sem várható hatás, akkor lehet határérték-vizsgálatot is végezni. Ha nincs megfelelő adat erre nézve, akkor tartománybehatároló vizsgálat is végezhető az alkalmazandó dózisok meghatározásának elősegítésére. Attól eltekintve, hogy a vizsgálandó anyagot nem alkalmazzák, a kontrollcsoportokban lévő állatokat ugyanúgy kell kezelni, mint a kezelt csoportokban lévőket. Ha a vizsgálandó anyag beadásához vivőanyagot alkalmaznak, a kontrollcsoportnak a legnagyobb alkalmazott térfogatban kell beadni a vivőanyagot.

1.5.3. A megbízhatóság ellenőrzése

A vizsgálatot végző laboratóriumnak adatokkal kell igazolnia, hogy el tudja végezni a vizsgálatot, illetve hogy az alkalmazott eljárások megfelelő érzékenységek. Az ilyen adatoknak bizonyítékkal kell szolgálniuk a megfigyelésre javasolt különféle végpontok, így például az autonóm tünetek, a szenzoros reaktivitás, a végtagok fogóereje, valamint a motoros aktivitás változásainak detektálására és adott esetben számszerűsítésére való képességet. A különböző típusú neurotoxicitás válaszokat kiváltó és pozitív kontrollként alkalmazható vegyületekkel kapcsolatos információk a (2) és a (9) hivatkozásban találhatók. Ha a kísérleti eljárások lényeges vonásai nem változnak, akkor korábbi adatok is felhasználhatók. Javasolt a korábbi adatok időszakos felfrissítése. Az eljárások érzékenységének fennmaradását igazoló új adatokra akkor van szükség, ha a vizsgálat vagy az eljárások valamely lényegi elemét a vizsgálatot végző laboratórium megváltoztatta.

1.5.4. A dózisok kiválasztása

A dózisszinteket a vizsgálandó vegyülettel vagy rokon anyagokkal kapcsolatban esetlegesen rendelkezésre álló korábbi toxicitási és kinetikai adatok figyelembevételével kell meghatározni. A legnagyobb dózist azt a célt szem előtt tartva kell megválasztani, hogy a neurotoxikus hatásokat vagy egyértelmű szisztémás toxikus hatásokat váltson ki. Ezt követően úgy kell csökkenő sorrendben kiválasztani a kisebb dózisokat, hogy meg lehessen határozni a dózissal összefüggő válaszokat, illetve a legkisebb dózisonál a nem észlelhető káros hatás szintjét (NOAEL). A dózisszinteket elvben úgy kell beállítani, hogy meg lehessen különböztetni az idegrendszerre gyakorolt elsődleges toxikus hatásokat a szisztémás toxicitással összefüggő hatásoktól. Gyakran optimális a két-három intervallum alkalmazása, és nagyon nagy intervallumok (pl. 10-nél magasabb szorzófaktor) alkalmazása esetén gyakran előnyös a dózisok közé egy negyedik vizsgálati csoportot is beiktatni. Ha létezik a humán expozícióra vonatkozóan elfogadható becslés, akkor ezt is figyelembe kell venni.

1.5.5. Határérték-vizsgálat

Ha egy egyetlen, legalább 1000 mg/testtömeg-kg/nap dózis alkalmazásával történő, az itt ismertetett eljárások szerint elvégzett vizsgálat nem idéz elő észlelhető neurotoxicitást és ha a szerkezetileg és/vagy metabolizmus szempontjából rokon vegyületekkel kapcsolatos adatok alapján nem várható toxicitás, a három dózisszint alkalmazásával történő teljes vizsgálatot esetenként szükségtelen elvégezni. A várható humán expozíció nagyobb orális dózis alkalmazását teszi esetenként szükségessé a határérték-vizsgálatban. Más típusú beadási módok, így például inhalálás vagy dermális alkalmazás esetén a vizsgálandó anyag fizikai-kémiai tulajdonságai gyakran előre jelezhetik a lehetséges expozíciós szint maximumát. Akut orális vizsgálat elvégzéséhez a határérték-vizsgálat során alkalmazott dózisonak legalább 2000 mg/kg-nak kell lennie.

1.5.6. A dózisok beadása

A vizsgálandó anyag dózisait legalább 28 napon át naponta, azaz heti hét napon át kell adagolni az állatoknak; ötnapos adagolási rend vagy rövidebb expozíciós időszak alkalmazását megfelelően indokolni kell. Ha a vizsgálandó anyagot szondán át adagolják, a dózist lehetőleg egyszerre kell egy gyomorszondán vagy megfelelő intubációs kanülön át beadni az állatnak. Az, hogy egyszerre maximálisan mekkora térfogatú folyadék adható be, a kísérleti állatok méretétől függ. A térfogat nem lehet 1 ml/100 g testtömeg-aránynál nagyobb. Vizes oldatok esetében azonban 2 ml/100 g testtömeg-arány is alkalmazható. Az irritáló vagy korróziós hatású anyagok kivételével, amelyek esetében a magasabb koncentrációk általában súlyosabb hatásokat okoznak, minimálisra kell csökkenteni a térfogatbeli eltéréseket, amihez a koncentrációkat kell úgy beállítani, hogy minden dózisszinten állandó térfogatot lehessen biztosítani.

A táplálékkal vagy ivóvízzel bejuttatott anyagok esetében fontos, hogy a vizsgálandó anyag mennyisége ne zavarja a normál táplálkozást vagy vízháztartást. Ha a vizsgálandó anyagot a táplálékkal juttatják be, vagy a táplálékbeli koncentrációt (ppm), vagy pedig az állat testtömegére számított dózist kell állandó értéken tartani, és meg kell adni, hogy melyik alternatívát alkalmazzák. A szondával bejuttatott anyagok esetében a dózist mindig a nap hasonló időszakában kell beadni, és szükség szerint újra és újra be kell állítani ahhoz, hogy az állat testtömegéhez viszonyítva állandó értéken lehessen tartani a dózist. Ha egy hosszú távú vizsgálat előtt előzetes vizsgálatként ismételt dózisu vizsgálatot végeznek, mindkét vizsgálatban hasonló takarmányt kell alkalmazni. Akut vizsgálatok esetén ha a dózist nem lehet egyszerre bejuttatni, akkor egy legfeljebb 24 órás időtartam alatt részletekben is beadható.

1.6. Megfigyelések

1.6.1. A megfigyelések és vizsgálatok gyakorisága

Ismételt dózisu vizsgálatok esetében a megfigyelési időszaknak az egész kezelési időszakot le kell fednie. Akut vizsgálatok esetében a kezelés után 14 napig kell még megfigyeléseket végezni. A mellékcsoporthoz tartozó és a kezelés utáni időszakban expozíció nélkül tartott állatok esetében a megfigyeléseknek ezt az időszakot is le kell fedniük.

A megfigyeléseket kellő gyakorisággal kell végezni, hogy az esetleges viselkedési és/vagy neurológiai rendellenességek észlelésének valószínűsége a lehető legnagyobb legyen. A megfigyeléseket lehetőleg mindig a nap azonos szakában kell végezni, és ehhez figyelembe kell venni azt is, hogy a várt hatások a dózis beadása után mikor érik el a maximumukat. A klinikai megfigyelések és funkcionális vizsgálatok gyakoriságát a 2. táblázatban foglaltuk össze. Ha a kinetikai adatok vagy más, korábbi vizsgálatokban kapott adatok szerint más időpontokat kellene alkalmazni a megfigyelésekhez, vizsgálatokhoz vagy megfigyelések utáni időszakokhoz, alternatív kísérleti programot kell követni a kinyerhető információk maximalizálása érdekében. A kísérleti program ilyen jellegű módosításait meg is kell indokolni.

1.6.1.1. Az általános egészségi állapot és a megbetegedések/elhullások megfigyelése

Az állatok egészségi állapotát legalább naponta egyszer, a megbetegedéseket és elhullásokat pedig naponta kétszer gondosan meg kell figyelni.

1.6.1.2. Részletes klinikai megfigyelések

Az első expozíciót megelőzően egy alkalommal (az egyeden belüli összehasonlításokhoz), majd ezt követően a vizsgálat teljes időtartamától függően különböző időközönként (lásd 2. táblázat) részletes klinikai megfigyeléseket kell végezni az erre a célra kiválasztott összes állaton (lásd 1. táblázat). A gyógyulási mellékcsoporthoz részletes klinikai megfi-

gyeléseit a gyógyulási időszak végén kell elvégezni. A részletes klinikai megfigyeléseket a ketrecen kívül, egy standard porondon kell végezni. Az észleléseket egy olyan pontozási rendszer segítségével kell gondosan felvenni, amely a megfigyelés során végzett minden egyes mérés esetében kritériumokat vagy pontozási skálákat is magában foglal. A vizsgáló laboratóriumnak világosan meg kell határoznia az alkalmazott kritériumokat vagy skálákat. Törekedni kell arra, hogy minimálisak legyenek a kísérleti körülmények közötti (a kezeléssel szisztematikusan nem összefüggő) eltérések, és hogy a megfigyeléseket az aktuális kezelést nem ismerő, képzett megfigyelők végezzék.

A megfigyeléseket ajánlatos megtervezetten végezni, amelynek során minden állatra vonatkozóan és minden megfigyelési időpontban világosan meghatározott (a normál »tartomány« meghatározását is magában foglaló) kritériumokat kell szisztematikusan alkalmazni. A »normál tartományt« megfelelően dokumentálni kell. Minden megfigyelt tünetet fel kell jegyezni. Ha megoldható, a megfigyelt tünetek erősségét is fel kell jegyezni. A klinikai megfigyelések többek között a bőr, a szőrzet, a szemek, a nyálkahártyák változásaira, szekréumok és exkrétumok, valamint az autonóm aktivitás megjelenésére (pl. könnyezés, szörmeredezés, pupillaméret, szokatlan légzési mintázat és/vagy szájon át történő légzés, szokatlan vizelet vagy székletürítés és elszíneződött vizelet) irányulnak.

Rögzíteni kell továbbá a testhelyzettel, aktivitási szinttel (pl. a standard porond csökkent vagy fokozott felderítése) és a mozgáskoordinációval kapcsolatos összes szokatlan választ is. A járás (pl. kacsázás, ataxia), a testtartás (pl. púpos tartás) és a megfogás, elhelyezés vagy más környezeti ingerekkel szembeni reaktivitás megváltozását, valamint a rángásos vagy görcsös mozgásokat, görcsös vonaglásokat vagy remegéseket, sztereotípiákat (pl. túlzott tisztálkodást, szokatlan fejmozgásokat, ismétlődő körbejárást) vagy bizarr viselkedést (pl. harapást vagy túlzott nyalogatást, öncsonkítást, hátrafelé menést, hangadást) vagy agressziót is fel kell jegyezni.

1.6.1.3. Funkcionális vizsgálatok

A részletes klinikai megfigyelésekhez hasonlóan az expozíció előtt, majd azt követően rendszeres időközönként funkcionális vizsgálatokat is kell végezni az erre kiválasztott összes állaton (lásd 1. táblázat). A funkcionális vizsgálatok gyakorisága is a teljes vizsgálat időtartamától függ (lásd 2. táblázat). A 2. táblázatban megadott megfigyelési időszakok mellett az extermináláshoz a lehető legközelebbi időpontban a gyógyulási mellékcsoportokban is funkcionális vizsgálatokat kell végezni. A funkcionális vizsgálatok során meg kell figyelni a különféle [pl. hallási, látási és propioceptív (5) (6) (7)] ingerekre adott szenzoros reaktivitást, és el kell végezni a végtagok fogóerejének (8), valamint a motoros aktivitásnak a vizsgálatát (9). A motoros aktivitást olyan automata berendezéssel kell mérni, amely az aktivitáscsökkenés és az aktivitásnövekedés kimutatására is képes. Ha egy másik meghatározott rendszert alkalmaznak, akkor annak kvantitatívnak kell lennie, és igazolni kell annak érzékenységét és megbízhatóságát is. Minden berendezés esetében ellenőrizni kell, hogy időben megbízhatóan, illetve az egyes berendezések egymáshoz képest konzisztensen működnek-e. A követendő eljárásokkal kapcsolatban a további részletek a vonatkozó hivatkozásokban találhatóak. Ha nincsenek olyan adatok (pl. szerkezet-aktivitási, epidemiológiai adatok vagy más toxikológiai vizsgálati adatok), amelyek potenciális neurotoxikus hatásokat jeleznének, fontolóra kell venni specializáltabb vizsgálatok végzését a szenzoros és motoros működés vagy a tanulás és a memória tanulmányozására, e lehetséges hatások részletesebb vizsgálata érdekében. A specializáltabb vizsgálatokkal és alkalmazásukkal kapcsolatban további információk az (1) hivatkozásban találhatóak.

Kivételes esetben ki lehet hagyni a funkcionális vizsgálatból azokat az állatokat, amelyeknél a toxicitás jelei olyan mérvűek, hogy már zavarják az adott vizsgálatot. Meg kell indokolni, amennyiben az ilyen állatokat kizárják valamely funkcionális vizsgálatból.

1.6.2. Testtömeg és táplálék/vízfogyasztás

A legfeljebb 90 napig tartó vizsgálatok esetében minden állat testtömegét legalább hetente egyszer meg kell mérni, továbbá legalább hetente a táplálékfogyasztást is ellenőrizni kell (illetve, ha a vizsgálandó anyagot az ivóvízzel adják be, akkor annak fogyasztását is). A hosszú távú vizsgálatok esetében az állatok testtömegét az első 13 hét során legalább hetente egyszer, majd azt követően legalább négyhetente meg kell mérni. Az első 13 hét során a táplálékfogyasztást (illetve, ha a vizsgálandó anyagot az ivóvízzel adjuk be, akkor annak fogyasztását is) legalább hetente, majd azt követően körülbelül háromhavonta kell megmérni, kivéve, ha az egészségi állapot változásai vagy testtömeg-változások azt másképp szabják meg.

1.6.3. Szemészeti vizsgálatok

A 28 napnál hosszabb vizsgálatok esetében lehetőleg minden állaton, de legalább a nagy dózissal kezelt és a kontrollcsoportokba tartozó állatokon a vizsgálandó anyag adagolásának megkezdése előtt, illetve a vizsgálat legvégén szemtűkör vagy ezzel egyenértékű és megfelelő eszköz alkalmazásával szemészeti vizsgálatokat kell végezni. Ha szemelváltozást tapasztalnak, vagy ha a klinikai tünetek alapján ez szükségesnek látszik, minden állatot meg kell vizsgálni. A hosszú távú vizsgálatok esetében a 13. héten is szemészeti vizsgálatot kell végezni. Nem kell szemészeti vizsgálatot végezni, ha ilyen adatok más, hasonló időtartamú és hasonló dózisszintek mellett történő vizsgálatokból már rendelkezésre állnak.

1.6.4. Hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatok

Ha a neurotoxicitási vizsgálatot ismételt dózisu szisztémás toxicitási vizsgálattal kombinálva végzik, a szisztémás toxicitási vizsgálat vonatkozó módszerében előírtaknak megfelelően hematológiai és klinikai biokémiai vizsgálatokat is végezni kell. A mintavételt úgy kell végrehajtani, hogy minimális legyen a potenciális viselkedés-neurológiai hatások kockázata.

1.6.5. Kórszövettani vizsgálatok

A neuropathológiai (idegkórtani) vizsgálatot úgy kell megtervezni, hogy egészítse ki és bővítse a vizsgálat *in vivo* fázisában tett megfigyeléseket. Ivaronként és csoportonként legalább 5 állatból (lásd az 1. táblázatot és a következő bekezdést) szövetmintát kell venni, amelyet azután általánosan elfogadott perfúziós és fixálási technikák alkalmazásával *in situ* fixálni kell [lásd a (3) hivatkozás 5. fejezetét és a (4) hivatkozás 50. fejezetét]. Minden makroszkóposan megfigyelhető változást fel kell jegyezni. Amennyiben a vizsgálatot önálló vizsgálatként végzik el a neurotoxicitás szűrése vagy a neurotoxikus hatások jellemzése céljából, a többi állat vagy specifikus viselkedés-neurológiai (10) (11), neuropathológiai (10) (11) (12) (13), neurokémiai (10) (11) (14) (15) vagy elektrofiziológiai (10) (11) (16) (17) eljárásokhoz használható fel, amelyek kiegészíthetik az itt ismertetett eljárásokat és vizsgálatokat, vagy növelhetik a kórszövettani vizsgálatok alanyainak számát. E kiegészítő eljárások különösen akkor lehetnek hasznosak, ha empirikus megfigyelések vagy a várható hatások specifikus típusú vagy specifikus célterületre irányuló neurotoxicitást jeleznek (2) (3). Más esetben a fennmaradó állatok az ismételt dózisu toxicitási vizsgálati módszerben leírt rutin patológiai értékelésekhez is felhasználhatók.

A paraffinba ágyazott mintákat megszokott festési eljárással, például hematoxilin-eozin festékekkel (H&E) kell megfesteni, és mikroszkópos vizsgálatokat kell végezni. Perifériás neuropátiák megfigyelése vagy gyanúja esetén műanyagba ágyazott perifériás idegszövetmintákat is vizsgálni kell. Egyes klinikai tünetek további helyek vizsgálatát vagy speciális festési eljárások alkalmazását tehetik szükségessé. A további vizsgálati helyekkel kapcsolatban útmutatás a (3) és (4) hivatkozásban található. Hasznos lehet továbbá, ha speciális festéseket alkalmaznak konkrét patológiai változások kimutatásához (18).

A központi és a perifériás idegrendszerből származó reprezentatív metszeteket szövettani vizsgálatoknak kell alávetni [lásd a (3) hivatkozás 5. fejezetét és a (4) hivatkozás 50. fejezetét]. A vizsgált területek általában a következők: az előagy, a nagyagy központi része, ezen belül a hippokampuszt keresztmetszet, a középagy, a kisagy, a híd, a nyúltvelő, a szem a látóideggel és a retinával együtt, a gerincvelő a nyaki és ágyéki duzzanatnál, a dorzális ideggyökér-ganglionok, a dorzális és ventrális ideggyökérrostok, a proximális ülőideg, a proximális sípcsonti ideg (a térdnél) és a sípcsonti ideg lábikraizom-ágai. A gerincvelőből és a perifériás idegekből készített metszeteknek mind keresztirányú vagy haránt-, mind hosszanti metszeteket tartalmazniuk kell. Figyelmet kell szentelni az idegrendszer érhálózatának is. Meg kell vizsgálni egy vázizommintát is, különösen a lábikraizomét. Különös figyelmet kell fordítani a központi és perifériás idegrendszernek azokra a sejtes és rostos struktúrájára és mintázatú területeire, amelyekre különösen hatást gyakorolnak a neurotoxikus anyagok.

A toxikus anyag által előidézett neuropathológiai elváltozásokkal kapcsolatban a (3) és a (4) hivatkozásban található útmutatás. Ajánlatos a szövetmintákat lépcsőzetesen megvizsgálni, ami azt jelenti, hogy először a nagy dózissal kezelt csoportokból származó metszeteket hasonlítjuk össze a kontrollcsoportból származókkal. Ha az ezekből a csoportokból származó mintákban nem láthatók neuropathológiai elváltozások, nincs szükség további vizsgálatra. Ha azonban neuropathológiai elváltozásokat észlelnek a nagy dózissal kezelt csoportokban, a köztes és kis dózisu csoportokból származó, potenciálisan érintett szövetekből készített mintákat is kóddal kell ellátni, majd egymás után meg kell vizsgálni őket.

Ha a kvalitatív vizsgálatok során bizonyítékot találnak valamilyen neuropathológiai elváltozásra, akkor az ilyen elváltozást mutató idegrendszeri területeken egy második vizsgálatot is el kell végezni. Az összes dóziscsoportban minden potenciálisan érintett területről metszeteket kell készíteni, amelyeket véletlenszerűen kódokkal kell ellátni, és a kód ismeretében hiányában ugyancsak véletlenszerűen kell őket megvizsgálni. Minden lézió esetében fel kell jegyezni azok gyakoriságát és súlyosságát. Miután minden dóziscsoportban kiértékeltek az összes területet, vissza lehet fejteni a kódot, és a dózis-válasz összefüggések megállapítása érdekében statisztikai elemzést lehet végezni. Ismertetni kell az egyes léziók súlyosságának fokozatait.

A neuropathológiai leleteket a viselkedési megfigyelésekkel és mérésekkel, továbbá a korábbi és párhuzamosan végzett szisztémás toxicitási vizsgálatokból származó adatokkal összefüggésben kell értékelni.

2. ADATOK

2.1. Az eredmények kezelése

Az állatokra vonatkozóan egyedi adatsorokat kell felvenni. Emellett az összes adatot táblázatos formában is össze kell foglalni úgy, hogy minden kezelt és kontrollcsoport esetében mutassa az állatok számát a vizsgálat kezdetén, valamint

azoknak a számát, amelyek a vizsgálat során elhullottak vagy humánus módon exterminálásra kerültek, illetve az elhullások és humánus okokból végzett exterminálás időpontját, a toxicitásra utaló tüneteket mutató állatok számát, a megfigyelt toxikus hatások leírását, ezen belül megjelenésük időpontját, valamint ezek időbeli lefolyását, típusát és súlyosságát, és végül a léziókat mutató állatok számát és ezen belül a lézió(k) típusát és súlyosságát.

2.2. Értékelés és az eredmények értelmezése

A vizsgálat eredményeit a viselkedés-neurológiai és neuropathológiai hatások (ha kiegészítő vizsgálatok is történtek, akkor emellett a neurokémiai vagy elektrofiziológiai hatások) és bármely más megfigyelt káros hatás előfordulása, súlyossága és viszonylagossága alapján kell értékelni. Ahol lehet, a számszerű eredményeket megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszer alkalmazásával kell kiértékelni. A statisztikai módszereket a vizsgálat tervezésekor kell megválasztani.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

- fizikai megjelenés (ezen belül izomerizáció, tisztaság és fizikai-kémiai tulajdonságok);
- azonosító adatok.

Vivőanyag (ha szükséges):

- a vivőanyag megválasztásának indoklása.

Kísérleti állatok:

- az alkalmazott faj/törzs;
- az állatok száma, életkora és ivara;
- származás, tartási körülmények, akklimatizálódás, takarmány stb.;
- az egyes állatok testtömege a vizsgálat kezdetén.

Kísérleti körülmények:

– a vizsgálandó anyag formulázásával/a táplálék előkészítésével, az elért koncentrációval, a készítmény stabilitásával és homogenizálásával kapcsolatos adatok;

– a beadott dózisok, ezen belül a vivőanyagra, valamint a beadott anyag térfogatára és fizikai formájára vonatkozó adatok részletes leírása;

- a vizsgálandó anyag adagolására vonatkozó adatok;

- a dózisszintek megválasztásának indoklása;

- az expozíció út és időtartam megválasztásának indoklása;

– adott esetben a vizsgálandó anyag táplálékban/ivóvízben lévő koncentrációjának (ppm) átszámítása a tényleges dózisra (mg/testtömeg-kg/nap);

- a táplálék és az ivóvíz minőségével kapcsolatos adatok.

Megfigyelések és vizsgálati eljárások:

- az egyes csoportokba tartozó állatoknak a perfúziós alcsoportokba való besorolásával kapcsolatos adatok;

– a pontozási rendszerrel kapcsolatos adatok, beleértve a részletes klinikai megfigyelések során alkalmazott kritériumokat és az egyes méréseknél használt pontozási skálát;

– a különféle (pl. hallási, látási és proprioceptív) ingerekre adott szenzoros reaktivitáshoz, a végtag-fogóerő értékeléséhez, a motoros aktivitás értékeléséhez (ezen belül az aktivitás detektálására alkalmazott automatikus berendezésekkel kapcsolatos adatok) alkalmazott funkcionális vizsgálatokkal és más alkalmazott eljárásokkal kapcsolatos adatok;

– a szemészeti vizsgálatokkal, valamint adott esetben a hematológiai vizsgálatokkal és klinikai biokémiai vizsgálatokkal kapcsolatos adatok, ideértve a vonatkozó alapértékeket is;

– a különleges viselkedés-neurológiai, neuropathológiai és neurokémiai vagy elektrofiziológiai eljárásokra vonatkozó adatok.

Eredmények:

- testtömeg/testtömeg-változások, ezen belül az extermináláskor mért testtömeg;

- adott esetben a táplálék- és vízfogyasztás;

- toxikus reakciók adatai ivaronként és dózisonként, ezen belül a toxicitás tünetei vagy az elhullás;

– a részletes klinikai megfigyelések jellege, súlyossága és időtartama (megjelenése és időbeli lefolyása) (valamint hogy visszafordítható-e);

- minden funkcionális vizsgálat eredményének részletes ismertetése;
 - boncolási eredmények;
 - adott esetben az összes viselkedés-neurológiai, neuropathológiai és neurokémiai vagy elektrofiziológiai eredmény részletes ismertetése;
 - adott esetben a felszívódással és metabolizmussal kapcsolatos adatok;
 - adott esetben az eredmények statisztikai elemzése.
- Az eredmények diszkussziója;
- dózis-válasz adatok;
 - bármely más toxikus hatás és a vizsgálandó vegyület neurotoxicitási potenciáljával kapcsolatban levont következtetések kapcsolata;
 - nem észlelt káros hatás szintje.
- Következtetések:
- javasolt a vizsgálandó vegyület teljes neurotoxicitásának konkrét megállapítása.

4. HIVATKOZÁSOK

- (1) OECD Guidance Document on Neurotoxicity Testing Strategies and Test Methods. OECD, Paris, In Preparation.
- (2) Test Guideline for a Developmental Neurotoxicity Study, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. In preparation.
- (3) World Health Organization (WHO) (1986). Environmental Health Criteria document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity associated with Exposure to Chemicals.
- (4) Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. (1980). Experimental and Clinical Neurotoxicology. Eds. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds. Williams and Wilkins, Baltimore) London.
- (5) Tupper, D.E. and Wallace, R.B. (1980). Utility of the Neurological Examination in Rats. *Acta Neurobiol. Exp.*, 40, 999–1003.
- (6) Gad, S.C. (1982). A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 691–704.
- (7) Moser, V.C., McDaniel, K.M. and Phillips, P.M. (1991). Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of amitraz. *Toxic. Appl. Pharmacol.*, 108, 267–283.
- (8) Meyer, O.A., Tilson, H.A., Byrd, W.C. and Riley, M.T. (1979). A Method for the Routine Assessment of Fore- and Hind- limb Grip Strength of Rats and Mice. *Neurobehav. Toxicol.*, 1, 233–236.
- (9) Crofton, K.M., Haward, J.L., Moser, V.C., Gill, M.W., Reirer, L.W., Tilson, H.A. and MacPhail, R.C. (1991) Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol. Teratol.*, 13, 599–609.
- (10) Tilson, H.A., and Mitchell, C.L. eds. (1992). Neurotoxicology Target Organ Toxicology Series. Raven Press, New York.
- (11) Chang, L.W., ed. (1995). Principles of Neurotoxicology. Marcel Dekker, New York.
- (12) Broxup, B. (1991). Neuopathology as a screen for Neurotoxicity Assessment. *J. Amer. Coll. Toxicol.*, 10, 689–695.
- (13) Moser, V.C., Anthony, D.C., Sette, W.F. and MacPhail, R.C. (1992). Comparison of Subchronic Neurotoxicity of 2-Hydroxyethyl Acrylate and Acrylamide in Rats. *Fund. Appl. Toxicol.*, 18, 343–352.
- (14) O’Callaghan, J.P. (1988). Neurotypic and Gliotypic Proteins as Biochemical Markers of Neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, 10, 445–452.
- (15) O’Callaghan J.P. and Miller, D.B. (1988). Acute Exposure of the Neonatal Rat to Triethyltin Results in Persistent Changes in Neurotypic and Gliotypic Proteins. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 244, 368–378.
- (16) Fox, D.A., Lowndes, H.E. and Birkamper, G.G. (1982). Electrophysiological Techniques in Neurotoxicology. In: Nervous System Toxicology. Mitchell, C.L. ed. Raven Press, New York, pp 299–335.
- (17) Johnson, B.L. (1980). Electrophysiological Methods in neurotoxicity Testing. In: Experimental and Clinical Neurotoxicology. Spencer, P.S. and Schaumburg, H.H. eds., Williams and Wilkins Co., Baltimore/London, pp. 726–742.
- (18) Bancroft, J.D. and Steven A. (1990). Theory and Practice of Histological Techniques. Chapter 17, Neuropathological Techniques. Lowe, James and Cox, Gordon eds. Churchill Livingstone.

1. táblázat

A csoportonként szükséges állatok minimális száma, ha a neurotoxicitási vizsgálatot külön, illetve más vizsgálatokkal együtt végezzük

	A neurotoxicitási vizsgálat elvégzésének módja:			
	Külön vizsgálat	A 28 napos vizsgálattal együtt végzett vizsgálat	A 90 napos vizsgálattal együtt végzett vizsgálat	A krónikus toxicitási vizsgálattal együtt végzett vizsgálat
Az állatok összlétszáma az egyes csoportokban	10 hím és 10 nőstény	10 hím és 10 nőstény	15 hím és 15 nőstény	25 hím és 25 nőstény
A funkcionális vizsgálatokhoz, ezen belül részletes klinikai megfigyelésekhez kiválasztott állatok száma	10 hím és 10 nőstény	10 hím és 10 nőstény	10 hím és 10 nőstény	10 hím és 10 nőstény
Az <i>in situ</i> perfúzióhoz és az ideg-kórszövettani vizsgálatokhoz kiválasztott állatok száma	5 hím és 5 nőstény	5 hím és 5 nőstény	5 hím és 5 nőstény	5 hím és 5 nőstény
Az ismételt dózisú/szubkrónikus/krónikus toxicitási megfigyelésekhez, hematológiai vizsgálatokhoz, klinikai biokémiai vizsgálatokhoz, kórszövettani vizsgálatokhoz stb. (ahogyan az a megfelelő útmutatókban szerepel) kiválasztott állatok száma		5 hím és 5 nőstény	10 hím [†] és 10 nőstény [†]	20 hím [†] és 20 nőstény [†]
Adott esetben kiegészítő megfigyelések	5 hím és 5 nőstény			
[†] Magában foglalja a neurotoxicitási vizsgálat keretében végzendő funkcionális vizsgálatokhoz és részletes klinikai megfigyelésekhez kiválasztott öt állatot is				

2. táblázat

A klinikai megfigyelések és funkcionális vizsgálatok gyakorisága

A megfigyelések típusai		A vizsgálat időtartama			
		Akut	28 napos	90 napos	Krónikus
Minden állatban	Általános egészségi állapot	naponta	naponta	naponta	naponta
	Elhullás/megbetegedés	naponta kétszer	naponta kétszer	naponta kétszer	naponta kétszer
A funkcionális megfigyelésekhez kiválasztott állatokban	Részletes klinikai megfigyelések	– az első expozíció előtt – az adagolást követően 8 órán belül a hatás csúcsának becsült időpontjában – az adagolás után 7 és 14 nappal	– az első expozíció előtt – ezt követően hetente egyszer	– az első expozíció előtt – egy alkalommal az expozíció első vagy második hetében – ezt követően háromhavonta	– az első expozíció előtt – egy alkalommal az expozíció első hónapjának végén – ezt követően háromhavonta

A megfigyelések típusai		A vizsgálat időtartama			
		Akut	28 napos	90 napos	Krónikus
	Funkcionális vizsgálatok	– az első expozíció előtt – az adagolást követően 8 órán belül a hatás csúcsának becsült időpontjában – az adagolás után 7 és 14 nappal	– az első expozíció előtt – a kezelés negyedik hetében, a lehető legközelebb az expozíciós időszak végéhez	– az első expozíció előtt – egy alkalommal az expozíció első vagy második hetében – ezt követően havonta	– az első expozíció előtt – egy alkalommal az expozíció első hónapjának végén – ezt követően háromhavonta

9. számú melléklet az 56/2005. (XI. 29.) EüM–KvVM–BM együttes rendelethez

C.21. TALAJLAKÓ MIKROORGANIZMUSOK: NITROGÉN-ÁTALAKÍTÁSI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer az OECD TG 216 (2000) módszer megfelelője.

1.1. Bevezetés

Ez a vizsgálati módszer egy olyan laboratóriumi módszert ismertet, amelynek célja annak vizsgálata, hogy az egyes vegyületek egyszeri expozíció esetén milyen hosszú távú hatásokat gyakorolnak a talajlakó mikroorganizmusok nitrogén-átalakítási aktivitására. A vizsgálat elsősorban az Európai és Földközi-tenger Melléki Növényvédelmi Szervezet ajánlásain alapul (1). Azonban más iránymutatásokat, ezen belül a German Biologische Bundesanstalt (2), az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (3), a SETAC (4), valamint a Nemzetközi Szabványügyi Szervezet (5) iránymutatásait is figyelembe vettünk. Az 1995-ben az olaszországi Belgirateban megrendezett, a talajok/üledékek kiválasztásával kapcsolatos OECD-munkaértekezleten (6) megegyezés született az e vizsgálatban alkalmazandó talajok számáról és típusáról. A talajminták gyűjtéséről, kezeléséről és tárolásáról szóló ajánlások egy ISO Útmutatón (7) és a belgiratei munkaértekezlet ajánlásain alapulnak. A vizsgálandó anyagok toxikus jellemzőinek meghatározása és értékelése során szükség lehet a talaj mikrobiális aktivitására gyakorolt hatások meghatározására, például olyan esetben, ha adatokra van szükség a növényvédő szereknek a talaj mikroflórájára gyakorolt esetleges mellékhatásaival kapcsolatban, vagy ha a talajlakó mikroorganizmusoknak növényvédő szerektől eltérő vegyületekkel szembeni expozíciója várható. A nitrogén-átalakítási vizsgálat végrehajtásának célja az ilyen vegyületeknek a talaj mikroflórájára gyakorolt hatásainak meghatározása. Amennyiben mezőgazdasági vegyi anyagok (pl. növényvédő szerek, műtrágyák, erdészeti vegyi anyagok) vizsgálatáról van szó, mind a nitrogén-átalakítási, mind a szénátalakítási vizsgálatot el kell végezni. Ha nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata történik, elég a nitrogén-átalakítási vizsgálatot elvégezni. Ha azonban a nitrogén-átalakítási vizsgálat az ilyen vegyületek esetében olyan EC₅₀-értékeket eredményez, amelyek a kereskedelmi forgalomban kapható nitrifikációgátló szerek (pl. nitrapirin) esetében tapasztalt tartományba esik, további információk gyűjtése érdekében a szénátalakítási vizsgálatot is el lehet végezni.

A talajok élő és élettelen komponensekből épülnek fel, amelyek komplex és heterogén elegyek formájában léteznek. A mikroorganizmusok számos fajjal fontos szerepet játszanak a termőtalajok szervesanyag-tartalmának lebontásában és átalakításában, hozzájárulva a talajok termékenységének különféle aspektusaihoz. Az ilyen biokémiai folyamatokat megzavaró hosszú távú hatások potenciálisan megzavarhatják a tápanyag-körforgalmat, ami megváltoztathatja a talaj termékenységét. Szén- és nitrogén-átalakítás minden termőtalajban folyik. Bár az e folyamatokért felelős mikrobaközösségek talajonként eltérőek, az átalakítási útvonalak lényegében azonosak.

Az ismertetett vizsgálati módszer célja valamely anyagnak az aerob feltalajokban zajló nitrogén-átalakítási folyamatra gyakorolt hosszú távú káros hatásainak kimutatása. A vizsgálati módszer lehetővé teszi az anyagnak a talaj mikroflórája által végzett szénátalakítására gyakorolt hatásainak becslését. A nitrátképződés a szén-nitrogén kötések felbomlása után megy végbe. Ha tehát a kezelt és az ellenőrző talajmintákban azonos a nitrátképződés sebessége, nagyon valószínű, hogy a főbb szénlebontási útvonalak épek és működőképesek. A vizsgálatához választott szubsztrátban (porított lucerna-

liszt) kedvező (általában 12:1 és 16:1 közötti) a szén-nitrogén arány. Emiatt a vizsgálat során csökken a szénéhezés, és ha a vegyi anyag károsítja a mikrobaközösségeket, azok 100 napon belül helyreállíthatódnak.

Azokat a tesztek, amelyekből ezt a vizsgálati módszert kifejlesztették, elsősorban olyan anyagokhoz dolgozták ki, amelyek esetében előre jelezhető a talajba kerülő mennyiség. Ez a helyzet például a növényvédő szerek esetében, amelyeknél ismert a szántóföldi alkalmazás mértéke. A mezőgazdasági vegyi anyagok esetében elegendő két, a várt vagy becsült alkalmazási mérték szempontjából releváns dózist alkalmazni. A mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálhatók aktív összetevőként (a.ö.) vagy formulázott terméként is. A vizsgálat azonban nem korlátozódik kizárólag a mezőgazdasági vegyi anyagokra. Mind a vizsgálandó anyagnak a talajban alkalmazott mennyiségét, mind az adatok kiértékelésének módját módosítva, a vizsgálat mezőgazdasági vegyi anyagoktól eltérő vegyületekre is alkalmazható, amelyek esetében nem ismert a talajba várhatóan bejutó mennyiség. A mezőgazdasági vegyi anyagoktól eltérő vegyületek esetében tehát egy sor koncentrációnál meg kell határozni a nitrogén-átalakításra gyakorolt hatásokat. Az ilyen vizsgálatokkal kapott adatok dózis-válasz görbék elkészítésére és EC_x -értékek számítására használhatók fel, ahol x jelentése % hatás.

1.2. Fogalom meghatározások

»Nitrogén-átalakítás«: a nitrogéntartalmú szerves anyagok mikroorganizmusok által végzett, ammonifikáción és nitrifikáción keresztüli végső lebontása a megfelelő szervetlen végtermékké, nitráttá.

» EC_x (hatásos koncentráció)«: a vizsgálandó anyag olyan talajbeli koncentrációja, amely x %-osan gátolja a nitrogén nitráttá alakulását.

» EC_{50} (közepes hatásos koncentráció)«: a vizsgálandó anyag olyan talajbeli koncentrációja, amely 50 százalékosan (50%-osan) gátolja a nitrogén nitráttá alakulását.

1.3. Referenciaanyagok

Nincs.

1.4. A vizsgálati módszer elve

Átszitált talajt porított növényi liszttel fel kell javítani, majd vagy kezelni kell a vizsgálandó anyaggal, vagy kezeletlenül kell hagyni (kontroll). Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén minimálisan két vizsgálati koncentráció alkalmazása ajánlott, amelyeket a szántóföldeken várható legmagasabb koncentráció függvényében kell megválasztani. Az inkubálás 0., 7., 14. és 28. napja után a kezelt és ellenőrző talajmintákat megfelelő oldószerrel extrahálni kell, és meg kell határozni a kivonatokban lévő nitrát mennyiségét. Ezt követően történik a kezelt talajokban mért nitrátképződés arányának összehasonlítása a kontrollokban mérttel, valamint a kezelt és az ellenőrző talajminták közötti százalékos eltérés kiszámítása. Minden vizsgálatot legalább 28 napig kell végezni. Ha a 28. napon a kezelt és nem kezelt talajok közötti különbség 25% vagy annál nagyobb, a méréseket legfeljebb 100 napig folytatni kell. Ha nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata történik, a vizsgálandó anyag egy sor különböző koncentrációját kell a talajmintákhoz adni, és 28 napos inkubálás után meg kell mérni a kezelt és az ellenőrző mintákban képződött nitrát mennyiségét. A különféle koncentrációk alkalmazásával kapott vizsgálati eredményeket regressziós modell segítségével kell elemezni, majd ki kell számítani az EC_x -értékeket (azaz az EC_{50} -et, az EC_{25} -öt és/vagy az EC_{10} -et). Lásd a fogalom meghatározásokat.

1.5. A vizsgálat érvényessége

A mezőgazdasági vegyi anyagokkal kapott vizsgálati eredmények értékelése az ellenőrző és a kezelt talajminták nitráttartalma közötti viszonylag kis különbségeken (azaz az átlag $\pm 25\%$ -a) alapul, így az ellenőrző minták közötti nagy eltérések hamis eredményekhez vezethetnek. A párhuzamos ellenőrző minták közötti eltérésnek $\pm 15\%$ -nál kisebbnek kell lennie.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. Eszközök

Kémiaiilag inert anyagból készült vizsgálati edényeket kell használni. Ezeknek megfelelő, a talajok inkubálására alkalmazott eljárással, például az ömlesztve inkubálással vagy egyedi talajminták sorozataként történő inkubálásával összhangban lévő kapacitásúnak kell lenniük (lásd az 1.7.1.2. szakaszt). Ügyelni kell egyrészt a vízvesztés minimalizálására, másrészt a gázcsere lehetővé tételére a vizsgálat során (például a vizsgálati edények perforált polietilén fóliával fedhetők le). Illékony anyagok vizsgálata esetén zárható és légmentesen záródó edényeket kell alkalmazni. Az edényeknek olyan méretűnek kell lenniük, hogy a talajminta térfogatuk körülbelül egynegyedéig töltsen fel őket.

Szabványos laboratóriumi eszközöket és ezen belül a következőket kell használni:

- keverő berendezés: mechanikai rázógép vagy ezzel egyenértékű más berendezés;
- centrifuga (3000 g) vagy szűrőeszköz (nitrátmentes szűrőpapírral);
- a nitrátanalízishez megfelelő érzékenységet és reprodukálhatóságot biztosító műszer.

1.6.2. A talajok kiválasztása és száma

Csak egyféle talaj használható. A javasolt talajjellemzők a következők:

- homoktartalom: legalább 50% és legfeljebb 75%;
- pH: 5,5–7,5;
- szerveszén-tartalom: 0,5–1,5%;
- meg kell mérni a mikrobiális biomasszát (8) (9), amelynek széntartalma a talaj teljes szerveszén-tartalmának legalább 1%-a kell hogy legyen.

Az esetek többségében az ilyen jellemzőkkel rendelkező talaj a legrosszabb helyzetet reprezentálja, mivel minimális a vizsgálándó vegyület adszorpciója, viszont maximális a hozzáférhetősége a mikroflóra számára. Következésképpen általában nincs szükség más talajokkal végzett vizsgálatokra. Bizonyos körülmények között azonban, például amikor a vizsgálándó anyag várható fő felhasználási területe a különleges talajok, például a savanyú erdőtalajok vagy az elektrostatikus töltéssel rendelkező vegyületek esetében is, szükség lehet egy másik talajtípus alkalmazására is.

1.6.3. A talajminták begyűjtése és tárolása

1.6.3.1. Gyűjtés

Részletes információkkal kell rendelkezni annak a szántóföldi területnek a történetéről, ahonnan a vizsgálati talajminta begyűjtése történik. Ilyen részletek például a pontos hely, a növénytakaró, a növényvédő szerekkel végzett kezelések időpontjai, a szerves és szervetlen trágyák alkalmazásai, a biológiai anyagok hozzáadása vagy a véletlen szennyezések. A talajminták gyűjtéséhez olyan helyet kell választani, amely hosszú távon használható erre a célra. Megfelelőek például az állandó legelők, az évente gabonatermést (kivéve kukoricát) hozó területek vagy a zöldtrágyával sűrűn bevetett területek. Követelmény, hogy a kiválasztott mintagyűjtési helyet a mintagyűjtést megelőzően legalább egy évig ne kezeljék növényvédő szerekkel. Továbbá legalább hat hónapig ne kapjon szerves trágyázást. Ásványi műtrágya alkalmazása csak akkor elfogadható, ha a haszonnövény igényeinek megfelelően történik, és a műtrágyázást követően legalább három hónapig nem szabad talajmintákat venni. Kerülni kell az ismert biocid hatású műtrágyákkal (pl. kalcium-cíánammiddal) kezelt talajok alkalmazását.

Kerülni kell a mintavételt hosszú (30 napnál hosszabb) ideig tartó szárazság vagy elvezesedés esetén, illetve közvetlenül ilyen időszakok után. Szántott talajok esetében a mintákat 0–20 cm mélységből kell venni. Legelők vagy egyéb olyan talajok esetében, amelyeket hosszú ideig (legalább egy vegetációs periódusig) nem szántanak fel, a mintavétel maximális mélysége 20 cm-nél kicsit több (pl. 25 cm) is lehet.

A talajmintákat olyan edényekben és olyan hőmérsékleti feltételek mellett kell elszállítani, amelyek garantálják, hogy a talaj eredeti tulajdonságai nem módosulnak szignifikáns mértékben.

1.6.3.2. Tárolás

Legelőnyösebb a frissen gyűjtött talajok alkalmazása. Ha a laboratóriumi tárolás nem kerülhető el, a talajok sötétben, 4 ± 2 °C-on legfeljebb három hónapig tárolhatók. A talajok tárolása során aerob körülményeket kell biztosítani. Ha a talajminták begyűjtése olyan területeken történt, ahol a talaj az év legalább három hónapjában fagyott, szóba jöhet hat hónapos, mínusz 18 °C és mínusz 22 °C közötti hőmérsékleten való tárolás is. Minden egyes kísérlet előtt meg kell mérni a tárolt talajok mikrobiális biomasszáját, és a biomassza szénttartalmának el kell érnie a talaj teljes szerveszén-tartalmának legalább 1%-át (lásd az 1.6.2. szakaszt).

1.6.4. A talaj kezelése és előkészítése a vizsgálatra

1.6.4.1. Előinkubálás

Tárolt talaj használata esetén (lásd az 1.6.3.2. szakaszt) ajánlatos 2-től 28 napig terjedő előinkubálást alkalmazni. Az előinkubálás során a talaj hőmérsékletének és nedvességtartalmának hasonlóknak kell lennie a vizsgálat során alkalmazott hőmérséklethez és nedvességtartalomhoz (lásd az 1.6.4.2. és az 1.7.1.3. szakaszt).

1.6.4.2. Fizikai-kémiai tulajdonságok

A talajból manuálisan el kell távolítani a nagyobb tárgyakat (például köveket, növényi részeket stb.), majd a túlzott kiszáradást kerülve a talajt nedvesen át kell szitálni úgy, hogy a részecskeméret legfeljebb 2 mm legyen. A talajminta nedvességtartalmát desztillált vagy ioncserélt vízzel a maximális víztartó képesség 40–60%-ára kell beállítani.

1.6.4.3. Szerves szubsztráttal történő javítás

A talajt megfelelő szerves szubsztráttal, például 12:1 és 16:1 közötti C:N arányú, porított zöldlucerna-fű-liszttel (fő összetevő: *Medicago sativa*) fel kell javítani. A javasolt lucerna-talaj arány 5 g lucerna per 1 kilogramm száraztalaj.

1.6.5. A vizsgálándó anyag előkészítése a talajon történő alkalmazáshoz

A vizsgálándó anyagot általában hordozó segítségével kell alkalmazni. A hordozó lehet víz (vízben oldható anyagok esetében) vagy valamely inert szilárd anyag, így például finom kvarchomok (részecskeméret: 0,1–0,5 mm). Kerülni kell a víztől eltérő folyékony hordozók (például szerves oldószerek, így például acetont, kloroformot) alkalmazását, mivel ezek károsíthatják a mikroflórát. Ha hordozóként homokot használunk, a homok be is vonható a megfelelő oldószerben feloldott vagy szuszpendált vizsgálándó anyaggal. Ilyen esetekben az oldószert a talajba való bekeverés előtt el kell párolog-

tatni. Ahhoz, hogy a vizsgálandó anyag optimális módon oszoljon szét a talajban, a következő arány ajánlott: 10 g homok per 1 kilogramm száraztalaj. Az ellenőrző mintákat ugyanilyen mennyiségű vízzel és/vagy kvarchomokkal kell kezelni.

Illékony vegyületek vizsgálata esetén, amennyire lehet, kerülni kell a kezelés közbeni veszteséget, valamint a vegyület talajban való homogén eloszlásának biztosítására is törekedni kell (például a vizsgálandó anyagot több helyen is be kell injektálni a talajba).

1.6.6. Vizsgálati koncentrációk

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább két koncentrációt kell alkalmazni. Az alacsonyabb koncentrációnak legalább a gyakorlatban a talajba várhatóan bejutó legnagyobb mennyiségnek kell megfelelnie, a magasabb koncentrációnak pedig az alacsonyabb koncentráció valamely többszörösének kell lennie. A talajhoz adott vizsgálandó anyag koncentrációját 5 cm-es mélységig egyenletes beépülést és 1,5 g/cm³-es talajtérfogat-sűrűséget feltételezve kell kiszámolni. A közvetlenül a talajra kihordott mezőgazdasági vegyi anyagok vagy az olyan vegyületek esetében, amelyeknek a talajba bejutó mennyisége előre jelezhető, az ajánlott vizsgálati koncentrációk a következők: a maximális becsült környezeti koncentráció (PEC) és ennek ötszöröse. Azoknak az anyagoknak az esetében, amelyeket egy időben várhatóan több alkalommal is kihordanak a talajokra, a vizsgálathoz alkalmazandó koncentráció a PEC-értéknek a kihordások maximálisan várható számával történő megszorásával számítható ki. A vizsgált magasabb koncentrációnak azonban nem szabad meghaladnia az egyszeri maximális alkalmazási arány tízszeresét. Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább öt, mértani sort alkotó koncentrációt kell alkalmazni. A vizsgált koncentrációknak le kell fedniük az EC_x-értékek meghatározásához szükséges tartományt.

1.7. A vizsgálat végrehajtása

1.7.1. Az expozíció körülményei

1.7.1.1. Kezelés és kontroll

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a talajt három, egyenlő tömegű részre kell osztani. Két részlethez a terméket is tartalmazó hordozót kell keverni, a harmadikhoz pedig csak hordozót (kontroll). Ajánlatos a kezelt és nem kezelt talajokat is legalább három másolati mintában vizsgálni. Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a talajt hat, egyenlő tömegű részletre kell osztani. Öthöz a vizsgálandó anyagot is tartalmazó hordozót kell keverni, a hatodikhoz pedig csak hordozót. A kezeléseket és az ellenőrző kísérleteket is ajánlatos legalább három másolati mintában végezni. Vigyázni kell arra, hogy az anyag homogén módon legyen elosztatva a kezelt talajmintákban. A bekeverés során el kell kerülni a talaj tömörödését vagy összezsugorodását.

1.7.1.2. A talajminták inkubálása

A talajminták inkubálása kétféle módon történhet: az egyes kezelt és nem kezelt talajokból vagy ömlesztett mintákat kell készíteni, vagy egy sor önálló és egyforma méretű részmintát. Illékony vegyületek vizsgálata esetén azonban a vizsgálatot csak egy önálló részmintákból álló sorozattal kell elvégezni. A talajok ömlesztve történő inkubálása esetén minden kezelt és nem kezelt talajt nagy mennyiségben kell elkészíteni, és a vizsgálat során szükség szerint ezekből kell részmintákat venni a különféle analízisekhez. Az, hogy kiindulásképpen milyen mennyiséget kell készíteni az egyes kezelésekhöz és ellenőrző vizsgálatokhoz, függ a részminták méretétől, az analízishez használt másolati minták számától, valamint a mintavételek várható maximális számától. A részminták vétele előtt az ömlesztve inkubált talajokat alaposan össze kell keverni. Ha a talajok inkubálása önálló részminták sorozataként történik, az egyes kezelt és nem kezelt ömlesztett talajmintákat a szükséges számú részmintára kell felosztani, amelyeket azután igény szerint kell felhasználni. Olyan kísérleteknél, amikor várhatóan több mint két alkalommal kell majd mintát venni, elegendő számú részmintát kell készíteni ahhoz, hogy azokból minden másolati mintára és mintavételi alkalomra jusson. A tesztalajokat legalább három másolati mintában kell aerob körülmények között inkubálni (lásd az 1.7.1.1. szakaszt). Minden egyes vizsgálat során megfelelő gőztérrel rendelkező edényeket kell használni annak érdekében, hogy ne alakuljanak ki anaerob körülmények. Illékony anyagok vizsgálata esetén a vizsgálatot csak egy önálló részmintákból álló sorozattal kell elvégezni.

1.7.1.3. A kísérlet körülményei és időtartama

A vizsgálatot sötétben, 20 ± 2 °C-os szobahőmérsékleten kell elvégezni. A talajmintákat a vizsgálat időtartama alatt a talaj maximális víztartó kapacitásának 40 és 60 százaléka közötti értéken kell tartani (lásd az 1.6.4.2. szakaszt) ± 5%-os eltéréssel. Szükség esetén desztillált vagy ioncserélt víz adható a mintákhoz.

A vizsgálat minimális időtartama 28 nap. Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén össze kell hasonlítani a kezelt és az ellenőrző mintákban mért nitrátképződési sebességet. Ha a 28. napon ezek több mint 25%-kal eltérnek egymástól, a vizsgálatot addig kell folytatni, amíg a különbség 25%-ra vagy az alá nem csökken, vagy legfeljebb 100 napig, ha az a korábbi időpont. A nem mezőgazdasági vegyi anyagok esetében a vizsgálat a 28 nap után véget ér. A 28. napon meg kell határozni a kezelt és az ellenőrző talajminták nitráttartalmát, és ki kell számítani az EC_x-értékeket.

1.7.2. Mintavétel és a talajok elemzése

1.7.2.1. Talajminta-vételi program

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a 0., 7., 14. és 28. napon meg kell mérni a talajminták nitráttartalmát. Ha hosszabb időtartamú vizsgálatot kell végezni, a nitráttartalom-méréseket a 28. nap után 14 naponta kell végezni.

Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább öt vizsgálati koncentrációt kell alkalmazni, és a talajminták nitráttartalmát az expozíciós időszak kezdetén (0. nap) és végén (28. nap) kell megmérni. Szükség esetén be lehet iktatni egy köztes mérést is, például a 7. napon. A 28. napon kapott adatok segítségével meg kell határozni a vegyület EC_x -értékeit. Szükség esetén a talaj kiindulási nitráttartalmának megadására a 0. napon az ellenőrző mintákban mért adatokat lehet felhasználni.

1.7.2.2. A talajminták analízise

Minden mintavételi időpontban meg kell határozni az egyes kezelt és ellenőrző másolati mintákban keletkezett nitrát mennyiségét. A nitrát kinyerése a talajból úgy történik, hogy a mintákat egy extrakciós oldószerrel, például 0,1 M kálium-klorid oldattal rázatni kell. A javasolt arány 5 ml KCl-oldat 1 gramm talajszárazsúly-egyenértékre. Az extrahálás optimalizálására érdekében a talajmintát és az extrakciós oldatot tartalmazó edények legfeljebb félig lehetnek. Az elegyeket 60 percig 150 rpm fordulatszámon kell rázatni. Ezt követően az elegyeket centrifugálni vagy szűrni kell, és a folyadékfázisban kell meghatározni a nitrát mennyiségét. A részecskementes folyékony kivonatok az analízist megelőzően mínusz 20 ± 5 °C-on legfeljebb hat hónapig tárolhatók.

2. ADATOK

2.1. Az eredmények kezelése

Mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálat esetén le kell jegyezni az egyes másolati talajmintákban képződött nitrát mennyiségét, és a másolati minták átlagát táblázatos formában kell megadni. A nitrogénátalakítási arányokat megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszerekkel (például F-teszt, 5%-os szignifikanciaszint) kell kiértékelni. A képződött nitrát mennyiségét mg nitrát/kg talaj (szárazsúly)/nap egységekben kell kifejezni. Az egyes kezeléseknél mért nitrátképződési sebességeket össze kell hasonlítani az ellenőrző mintában mérttel, és ki kell számítani az ellenőrző mintától való százalékos eltérést.

Nem mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálat esetén meg kell határozni az egyes másolati mintákban képződött nitrát mennyiségét, és dózis-válasz görbét kell felvenni az EC_x -értékek becsléséhez. A kezelt minták 28 nap után mért nitráttartalmát [mg nitrát/kg talaj (szárazsúly)] össze kell hasonlítani az ellenőrző mintákban mérttel. Ezekből az adatokból ki kell számítani az egyes vizsgálati koncentrációkra vonatkozó %-os gátlási értékeket.

A százalékos értékeket a koncentráció függvényében kell ábrázolni, majd statisztikai eljárások alkalmazásával ki kell számítani az EC_x -értékeket. A számított EC_x -értékek konfidenciahatárát ($p = 0,95$) is a szabványos eljárások segítségével kell meghatározni (10) (11) (12).

A nagy mennyiségű nitrogént tartalmazó vizsgálandó anyagok növelhetik a vizsgálat során képződött nitrát mennyiségét. Ha magas koncentrációban történik az ilyen anyagok (azaz olyan vegyi anyagok, amelyek várhatóan ismételt ki-hordással kerülnek felhasználásra) vizsgálata, gondoskodni kell a megfelelő ellenőrző mintákról (talaj plusz vizsgálandó anyag, növényi liszt hozzáadása nélkül). Az ilyen ellenőrző mintákból származó adatokat is figyelembe kell venni az EC_x -értékek számításakor.

2.2. Az eredmények értelmezése

Ha a mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálatok eredményeinek értékelésekor az alacsonyabb koncentrációjú kezeléssel (azaz a maximális becsült koncentrációval) és az ellenőrző mintákkal kapott nitrátképződési arányok különbsége a 28. nap utáni mintavételi időpontok valamelyikénél nem haladja meg a 25%-ot, azt a következtetést kell levonni, hogy a terméknek nincs hosszú távú hatása a talajokban zajló nitrogénátalakításra. A nem mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálatok esetében a vegyületek értékeléséhez az EC_{50} -, EC_{25} - és/vagy EC_{10} -értékeket kell használni.

3. JELENTÉS

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

a talaj teljes körű azonosítása, ezen belül:

- a terület földrajzi meghatározása (földrajzi hosszúság és szélesség);
- a terület történetével kapcsolatos információk (növénytakaró, növényvédő szerekkel való kezelés, műtrágyázás, véletlen szennyezések stb.);
- földhasználat (például mezőgazdasági talaj, erdő stb.);

- a mintavétel mélysége (cm);
- homok-/iszap-/agyagtartalom (% szárazsúly);
- pH (vízben);
- szervesszén-tartalom (% szárazsúly);
- nitrogéntartalom (% szárazsúly);
- kiindulási nitrátkoncentráció (mg nitrát/kg szárazsúly);
- kationcserélő kapacitás (mmol/kg);
- mikrobiális biomassza a teljes szervesszén-tartalom százalékában kifejezve;
- hivatkozások az egyes paraméterek meghatározásához alkalmazott módszerekre;
- a talajminták gyűjtésével és tárolásával kapcsolatos minden információ;
- adott esetben a talaj előinkubálásával kapcsolatos részletek.

Vizsgálandó anyag:

- fizikai jelleg és adott esetben fizikai-kémiai tulajdonságok;
- kémiai azonosító adatok, és ezen belül adott esetben a szerkezeti képlet, tisztaság (növényvédő szerek esetében az aktív összetevő százalékos aránya), nitrogéntartalom.

Szubsztrát:

- a szubsztrát származása;
- összetétel (lucernaliszt, zöldlucernafű-liszt);
- szén- és nitrogéntartalom (% szárazsúly);
- szitaméret (mm).

Vizsgálati körülmények:

- a talaj szerves szubsztráttal való javításának részletei;
- a vizsgálandó vegyi anyag alkalmazott koncentrációinak száma és adott esetben a koncentrációk megválasztásának indoklása;
- a vizsgálandó anyag talajon való alkalmazásának részletei;
- inkubálási hőmérséklet;
- a talaj nedvességtartalma a vizsgálat kezdetén és a vizsgálat alatt;
- az alkalmazott talajinkubálási módszer (ömlesztett minták vagy önálló részminták sorozata);
- másolati minták száma;
- mintavételi időpontok;
- a talaj nitráttartalmának extrahálására alkalmazott módszer;

eredmények:

- a nitrátmeghatározáshoz alkalmazott analitikai eljárás és berendezés;
- táblázatos formában megadott adatok, ezen belül a nitrátmérések egyedi és átlagértékei;
- a másolati minták közötti eltérések a kezelt és ellenőrző mintákban;
- adott esetben a számításoknál alkalmazott korrekciók magyarázata;
- az egyes mintavételi időpontokban mért nitrátképződési sebességek százalékos eltérése vagy adott esetben a 95 százalékos konfidenciahatárral meghatározott EC_{50} -érték, a többi EC_x -érték (az EC_{25} vagy az EC_{10}) konfidencia-intervallumokkal, és a dózis-válasz görbe grafikonja;
- az eredmények statisztikai kezelése;
- az eredmények értelmezését segítő minden információ és megfigyelés.

4. HIVATKOZÁSOK

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1–1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Bruxelles.

(5) ISO/DIS 14238 (1995). Soil Quality – Determination of Nitrogen Mineralisation and Nitrification in Soils and the Influence of Chemicals on these Processes. Technical Committee ISO/TC 190/SC 4: Soil Quality – Biological Methods.

(6) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italie, 18–20 janvier 1995.

(7) ISO 10381–6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory. (Talajminőség – Mintavétel – A mikrobiális folyamatok laboratóriumi értékelésére szolgáló talaj begyűjtésére, kezelésére és tárolására vonatkozó iránymutatás.)

(8) ISO 14240–1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 1. rész: Szubsztrátindukált respirációs módszer.)

(9) ISO 14240–2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 2. rész: Gőzextrakciós módszer.)

(10) Litchfield, J.T. and Wilcoxon F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. Jour. Pharmacol. and Exper. Ther., 96, 99–113.

(11) Finney, D.J. (1971). Probit Analysis. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(12) Finney, D.J. (1978). Statistical Methods in biological Assay. Griffin, Weycombe, UK.

C.22. TALAJLAKÓ MIKROORGANIZMUSOK: SZÉNÁTALAKÍTÁSI VIZSGÁLAT

1. MÓDSZER

Ez a módszer az OECD TG 217 (2000) módszer megfelelője.

1.1. Bevezetés

Ez a vizsgálati módszer egy olyan laboratóriumi módszert ismertet, amelynek célja annak vizsgálata, hogy a növényvédő szerek és esetleg más vegyi anyagok egyszeri expozíció esetén milyen potenciális hosszú távú hatásokat gyakorolnak a talajlakó mikroorganizmusok szénátalakítási aktivitására. A vizsgálat elsősorban az Európai és Földközi-tenger Melléki Növényvédelmi Szervezet ajánlásain alapul (1). Azonban más iránymutatásokat, ezen belül a German Biologische Bundesanstalt (2), az Egyesült Államok Környezetvédelmi Hivatala (3) és a SETAC (4) iránymutatásait is figyelembe vettünk. Az 1995-ben az olaszországi Belgirateban megrendezett, a talajok/üledékek kiválasztásával kapcsolatos OECD-munkaértekezleten (5) megegyezés született az e vizsgálatban alkalmazandó talajok számáról és típusáról. A talajminták gyűjtéséről, kezeléséről és tárolásáról szóló ajánlások egy ISO Útmutatón (6) és a belgiratei munkaértekezlet ajánlásain alapulnak.

A vizsgálandó anyagok toxikus jellemzőinek meghatározása és értékelése során szükség lehet a talaj mikrobiális aktivitására gyakorolt hatások meghatározására, például olyan esetben, ha adatokra van szükség a növényvédő szereknek a talaj mikroflórájára gyakorolt esetleges mellékhatásaival kapcsolatban, vagy ha a talajlakó mikroorganizmusoknak növényvédő szerektől eltérő vegyületekkel szembeni expozíciója várható. A szénátalakítási vizsgálat végrehajtásának célja az ilyen vegyületeknek a talaj mikroflórájára gyakorolt hatásainak meghatározása. Amennyiben mezőgazdasági vegyi anyagok (pl. növényvédő szerek, műtrágyák, erdészeti vegyi anyagok) vizsgálatáról van szó, mind a szénátalakítási, mind a nitrogénátalakítási vizsgálatot el kell végezni. Ha nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata történik, elég a nitrogénátalakítási vizsgálatot elvégezni. Ha azonban a nitrogénátalakítási vizsgálat az ilyen vegyületek esetében olyan EC_{50} -értékeket eredményez, amelyek a kereskedelmi forgalomban kapható nitrifikációgátló szerek (pl. nitrapirin) esetében tapasztalt tartományba esik, további információk gyűjtése érdekében a szénátalakítási vizsgálatot is el lehet végezni.

A talajok élő és élettelen komponensekből épülnek fel, amelyek komplex és heterogén elegyek formájában léteznek. A mikroorganizmusok számos fajjal fontos szerepet játszanak a termőtalajok szervesanyag-tartalmának lebontásában és átalakításában, hozzájárulva a talajok termékenységének különféle aspektusaihoz. Az ilyen biokémiai folyamatokat megzavaró hosszú távú hatások potenciálisan megzavarhatják a tápanyag-körforgalmat, ami megváltoztathatja a talaj termékenységét. Szén- és nitrogénátalakítás minden termőtalajban folyik. Bár az e folyamatokért felelős mikrobaközösségek talajonként eltérőek, az átalakítási útvonalak lényegében azonosak.

Ennek a vizsgálati módszernek a célja valamely anyagnak az aerob feltalajokban zajló szénátalakítási folyamatra gyakorolt hosszú távú káros hatásainak kimutatása. A vizsgálati módszer érzékeny a szénátalakításért felelős mikrobaközösségek méretében és aktivitásában bekövetkező változásokra, mivel ez kémiai stresszt és szénéhezést okoz ezekben a közösségekben. A vizsgálathoz alacsony szervesanyag-tartalmú homokos talajt kell használni. Ezt a talajt kezelni kell a vizsgálandó anyaggal, majd gyors mikrobiális anyagcserét biztosító körülmények között inkubálni kell. Ilyen körülmények között hamar kimerülnek a talaj könnyen hozzáférhető szénforrásai. Ez szénéhezést okoz, ami elpusztítja a mikrobákat és egyben nyugalmi állapotot és/vagy spóráképzést idéz elő. Ha a vizsgálat több mint 28 napig tart, e reakciók összessége a kontroll- (kezeletlen) talajokban a metabolikusan aktív mikrobiális biomassza progresszív elvesztéseként mérhető (7). Ha valamely vegyi anyag jelenléte a vizsgálat körülményei között befolyást gyakorol a szénstresszelt talaj-

ban található biomasszára, akkor a biomassza nem tud visszatérni ugyanarra a szintre, mint a kontrolltalajokban. A vizsgálandó anyag által a vizsgálat során bármikor előidézett zavaró hatás tehát gyakran egészen a vizsgálat végéig fennmarad.

Azokat a tesztek, amelyekből ezt a vizsgálati módszert kifejlesztették, elsősorban olyan anyagokhoz dolgozták ki, amelyek esetében előre jelezhető a talajba kerülő mennyiség. Ez a helyzet például a növényvédő szerek esetében, amelyeknél ismert a szántóföldi alkalmazás mértéke. A mezőgazdasági vegyi anyagok esetében elegendő két, a várt vagy becsült alkalmazási mérték szempontjából releváns dózist alkalmazni. A mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálhatók aktív összetevőként (a.ö.) vagy formulázott terméként is. A vizsgálat azonban nem korlátozódik kizárólag a megbecsülhető környezeti koncentrációval rendelkező anyagokra. Mind a vizsgálandó anyagnak a talajban alkalmazott mennyiségét, mind az adatok kiértékelésének módját módosítva, a vizsgálat mezőgazdasági vegyi anyagoktól eltérő vegyületekre is alkalmazható, amelyek esetében nem ismert a talajba várhatóan bejutó mennyiség. A nem mezőgazdasági vegyi anyagok esetében tehát egy sor koncentrációnál meg kell határozni a szénátalakításra gyakorolt hatásokat. Az ilyen vizsgálatokkal kapott adatok dózis-válasz görbék elkészítésére és EC_x -értékek számítására használhatók fel, ahol x jelentése % hatás.

1.2. Fogalommeghatározások

»Szénátalakítás«: szerves anyagok mikroorganizmusok által végzett lebontása a megfelelő szervesetlen végtermékké, azaz szén-dioxiddá.

» EC_x (hatásos koncentráció)«: a vizsgálandó anyag olyan talajbeli koncentrációja, amely x %-osan gátolja a szén szén-dioxiddá alakulását.

» EC_{50} (közepes hatásos koncentráció)«: a vizsgálandó anyag olyan talajbeli koncentrációja, amely 50 százalékosan (50%-osan) gátolja a szén szén-dioxiddá alakulását.

1.3. Referenciaanyagok

Nincs.

1.4. A vizsgálati módszer elve

Az átszitált talajt a vizsgálandó anyaggal kell kezelni, vagy kezeletlenül kell hagyni (kontroll). Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén minimálisan két vizsgálati koncentráció alkalmazása ajánlott, amelyeket a szántóföldeken várható legmagasabb koncentráció függvényében kell megválasztani. Az inkubálás 0., 7., 14. és 28. napja után a kezelt és az ellenőrző talajmintákhoz glükózt kell keverni, majd 12 órán át folyamatosan mérni kell a glükózindukált légzési sebességet. A légzési sebességet a felszabaduló szén-dioxidban (mg szén-dioxid/kg száraz talaj/óra) vagy az elfogyasztott oxigénben (mg oxigén/kg talaj/óra) kell kifejezni. A kezelt talajokban mért közepes légzési rátát össze kell hasonlítani az ellenőrző minta esetében mérttel, majd ki kell számítani a kezelt és az ellenőrző talajminták közötti százalékos eltérést. Minden vizsgálatot legalább 28 napig kell végezni. Ha a 28. napon a kezelt és nem kezelt talajok közötti különbség 25% vagy annál nagyobb, a méréseket 14 napos intervallumokban, legfeljebb 100 napos időtartamig folytatni kell. Ha nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata történik, a vizsgálandó anyag egy sor különböző koncentrációját kell a talajmintákhoz adni, és 28 nap után meg kell mérni a kezelt és az ellenőrző mintákban a glükózindukált légzési sebességeket (azaz a képződő szén-dioxid vagy az elfogyasztott oxigén átlagos mennyiségét). A különböző koncentrációk alkalmazásával kapott vizsgálati eredményeket regressziós modell segítségével kell elemezni, majd ki kell számítani az EC_x -értékeket (azaz az EC_{50} -et, az EC_{25} -öt és/vagy az EC_{10} -et). Lásd a fogalommeghatározásokat.

1.5. A vizsgálat érvényessége

A mezőgazdasági vegyi anyagokkal kapott vizsgálati eredmények értékelése az ellenőrző és a kezelt talajmintákban felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén közötti viszonylag kis különbségeken (azaz az átlag $\pm 25\%$ -a) alapul, így az ellenőrző minták közötti nagy eltérések hamis eredményekhez vezethetnek. A párhuzamos ellenőrző minták közötti eltérésnek $\pm 15\%$ -nál kisebbnek kell lennie.

1.6. A vizsgálati módszer leírása

1.6.1. Eszközök

Kémiaiilag inert anyagból készült vizsgálati edényeket kell használni. Ezeknek megfelelő, a talajok inkubálására alkalmazott eljárással, például az ömlesztve inkubálással vagy egyedi talajminták sorozataként történő inkubálással megfelelő összhangban lévő kapacitásúnak kell lenniük (lásd az 1.7.1.2. szakaszt). Ügyelni kell egyrészt a vízvesztés minimalizálására, másrészt a gázcsere lehetővé tételére a vizsgálat során (például a vizsgálati edények perforált poli-tilén fóliával fedhetők le). Illékony anyagok vizsgálata esetén zárható és légmentesen záródó edényeket kell alkalmazni. Az edényeknek olyan méretűnek kell lenniük, hogy a talajminta térfogatuk körülbelül egynegyedéig töltse fel őket.

A glükózindukált légzés meghatározásához inkubáló-rendszerekre és a szén-dioxid termelés vagy az oxigénfogyasztás mérésére alkalmas műszerekre van szükség. Ilyen rendszerekre és műszerekre példák a (8) (9) (10) és (11) hivatkozásban találhatók.

1.6.2. A talajok kiválasztása és száma

Csak egyféle talaj használható. A javasolt talajjellemzők a következők:

- homoktartalom: legalább 50% és legfeljebb 75%;
- pH: 5,5–7,5;
- szervesszén-tartalom: 0,5–1,5%;
- meg kell mérni a mikrobiális biomaszt (12) (13), amelynek széntartalma a talaj teljes szervesszén-tartalmának legalább 1%-a kell hogy legyen.

Az esetek többségében az ilyen jellemzőkkel rendelkező talaj a legrosszabb helyzetet reprezentálja, mivel minimális a vizsgálendő vegyület adszorpciója, viszont maximális a hozzáférhetősége a mikroflóra számára. Következésképpen általában nincs szükség más talajokkal végzett vizsgálatokra. Bizonyos körülmények között azonban, például amikor a vizsgálendő anyag várható fő felhasználási területe a különleges talajok, például a savanyú erdőtalajok vagy az elektrostatikus töltéssel rendelkező vegyületek esetében is, szükség lehet ennek egy másik talajtípussal való helyettesítésre.

1.6.3. A talajminták begyűjtése és tárolása

1.6.3.1. Gyűjtés

Részletes információkkal kell rendelkezni annak a szántóföldi területnek a történetéről, ahonnan a vizsgálati talajminta begyűjtése történik. Ilyen részletek például a pontos hely, a növénytakaró, a növényvédő szerekkel végzett kezelések időpontjai, a szerves és szervetlen trágyák alkalmazásai, a biológiai anyagok hozzáadása vagy a véletlen szennyezések. A talajminták gyűjtéshez olyan helyet kell választani, amely hosszú távon használható erre a célra. Megfelelőek például az állandó legelők, az évente gabonatermést (kivéve kukoricát) hozó területek vagy a zöldtrágyával sűrűn bevetett területek. Követelmény, hogy a kiválasztott mintagyűjtési helyet a mintagyűjtést megelőzően legalább egy évig ne kezeljék növényvédő szerekkel. Továbbá legalább hat hónapig ne kapjon szerves trágyázást. Ásványi műtrágya alkalmazása csak akkor elfogadható, ha a haszonnövény igényeinek megfelelően történik, és a műtrágyázást követően legalább három hónapig nem szabad talajmintákat venni. Kerülni kell az ismert biocid hatású műtrágyákkal (pl. kalcium-ciánamiddal) kezelt talajok alkalmazását.

Kerülni kell a mintavételt hosszú (30 napnál hosszabb) ideig tartó szárazság vagy elvizesedés esetén, illetve közvetlenül ilyen időszakok után. Szántott talajok esetében a mintákat 0–20 cm mélységből kell venni. Legelők vagy egyéb olyan talajok esetében, amelyeket hosszú ideig (legalább egy vegetációs periódusig) nem szántanak fel, a mintavétel maximális mélysége 20 cm-nél kicsit több (pl. 25 cm) is lehet. A talajmintákat olyan edényekben és olyan hőmérsékleti feltételek mellett kell elszállítani, amelyek garantálják, hogy a talaj eredeti tulajdonságai nem módosulnak szignifikáns mértékben.

1.6.3.2. Tárolás

Legelőnyösebb a frissen gyűjtött talajok alkalmazása. Ha a laboratóriumi tárolás nem kerülhető el, a talajok sötétben, 4 ± 2 °C-on legfeljebb három hónapig tárolhatók. A talajok tárolása során aerob körülményeket kell biztosítani. Ha a talajminták begyűjtése olyan területeken történt, ahol a talaj az év legalább három hónapjában fagyott, szóba jöhet hat hónapos, mínusz 18 °C hőmérsékleten való tárolás is. Minden egyes kísérlet előtt meg kell mérni a tárolt talajok mikrobiális biomaszát, és a biomassza széntartalmának el kell érnie a talaj teljes szervesszén-tartalmának legalább 1%-át (lásd az 1.6.2. szakaszt).

1.6.4. A talaj kezelése és előkészítése a vizsgálatra

1.6.4.1. Előinkubálás

Tárolt talaj használata esetén (lásd az 1.6.4.2. és az 1.7.1.3. szakaszt) ajánlatos 2-től 28 napig terjedő előinkubálást alkalmazni. Az előinkubálás során a talaj hőmérsékletének és nedvességtartalmának hasonlóknak kell lennie a vizsgálat során alkalmazott hőmérséklethez és nedvességtartalomhoz (lásd az 1.6.4.2. és az 1.7.1.3. szakaszt).

1.6.4.2. Fizikai-kémiai tulajdonságok

A talajból manuálisan el kell távolítani a nagyobb tárgyakat (például köveket, növényi részeket stb.), majd a túlzott kiszáradást kerülve a talajt nedvesen át kell szitálni úgy, hogy a részecskeméret legfeljebb 2 mm legyen. A talajminta nedvességtartalmát desztillált vagy ioncserélt vízzel a maximális víztartó képesség 40–60%-ára kell beállítani.

1.6.5. A vizsgálendő anyag előkészítése a talajon történő alkalmazáshoz

A vizsgálendő anyagot általában hordozó segítségével kell alkalmazni. A hordozó lehet víz (vízben oldható anyagok esetében) vagy valamely inert szilárd anyag, így például finom kvarchomok (részecskeméret: 0,1–0,5 mm). Kerülni kell a víztől eltérő folyékony hordozók (például szerves oldószerek, így például aceton, kloroform) alkalmazását, mivel ezek károsíthatják a mikroflórát. Ha hordozóként homokot használunk, a homok be is vonható a megfelelő oldószerben feloldott vagy szuszpendált vizsgálendő anyaggal. Ilyen esetekben az oldószert a talajba való bekeverés előtt el kell párologtatni. Ahhoz, hogy a vizsgálendő anyag optimális módon oszoljon szét a talajban, a következő arány ajánlott: 10 g homok per 1 kilogramm száraztalaj. Az ellenőrző mintákat ugyanilyen mennyiségű vízzel és/vagy kvarchomokkal kell kezelni.

Illékony vegyületek vizsgálata esetén kerülni kell a kezelés közbeni veszteséget, valamint a vegyület talajban való homogén eloszlásának biztosítására is törekedni kell (például a vizsgálandó anyagot több helyen is be kell injektálni a talajba).

1.6.6. Vizsgálati koncentrációk

Növényvédő szerek és egyéb, megbecsülhető környezeti koncentrációval rendelkező vegyületek vizsgálata esetén legalább két koncentrációt kell alkalmazni. Az alacsonyabb koncentrációnak legalább a gyakorlatban a talajba várhatóan bejutó legnagyobb mennyiségnek kell megfelelnie, a magasabb koncentrációnak pedig az alacsonyabb koncentráció valamely többszörösének kell lennie. A talajhoz adott vizsgálandó anyag koncentrációját 5 cm-es mélységig egyenletes beépülés és 1,5 g/cm³-es talajtérfogat-sűrűséget feltételezve kell kiszámolni. A közvetlenül a talajra kihordott mezőgazdasági vegyi anyagok vagy az olyan vegyületek esetében, amelyeknek a talajba bejutó mennyisége előre jelezhető, az ajánlott vizsgálati koncentrációk a következők: a megbecsülhető környezeti koncentráció (PEC) és ennek ötszöröse. Azoknak az anyagoknak az esetében, amelyeket egy idényben várhatóan több alkalommal is kihordanak a talajokra, a vizsgálathoz alkalmazandó koncentráció a PEC-értéknek a kihordások maximálisan várható számával történő megszorzásával számítható ki. A vizsgált magasabb koncentrációnak azonban nem szabad meghaladnia az egyszeri maximális alkalmazási arány tízszeresét.

Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább öt, mértani sort alkotó koncentrációt kell alkalmazni. A vizsgált koncentrációknak le kell fedniük az EC_x-értékek meghatározásához szükséges tartományt.

1.7. A vizsgálat végrehajtása

1.7.1. Az expozíció körülményei

1.7.1.1. Kezelés és kontroll

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a talajt három, egyenlő tömegű részre kell osztani. Két részlethez a terméket is tartalmazó hordozót kell keverni, a harmadikhoz pedig csak hordozót (kontroll). Ajánlatos a kezelt és nem kezelt talajokat is legalább három másolati mintában vizsgálni. Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a talajt hat, egyenlő tömegű részletre kell osztani. Öthöz a vizsgálandó anyagot is tartalmazó hordozót kell keverni, a hatodikhoz pedig csak hordozót. A kezeléseket és az ellenőrző kísérleteket is ajánlatos legalább három másolati mintában végezni. Vigyázni kell arra, hogy az anyag homogén módon legyen elosztatva a kezelt talajmintákban. A bekeverés során el kell kerülni a talaj tömörödését vagy összezsugorodását.

1.7.1.2. A talajminták inkubálása

A talajminták inkubálása kétféle módon történhet: az egyes kezelt és nem kezelt talajokból vagy ömlesztett mintákat kell készíteni, vagy egy sor önálló és egyforma méretű részmintát. Illékony vegyületek vizsgálata esetén azonban a vizsgálatot csak egy önálló részmintákból álló sorozattal kell elvégezni. A talajok ömlesztve történő inkubálása esetén minden kezelt és nem kezelt talajt nagy mennyiségben kell elkészíteni, és a vizsgálat során szükség szerint ezekből kell részmintákat venni a különféle analízisekhez. Az, hogy kiindulásképpen milyen mennyiséget kell készíteni az egyes kezelésekhöz és ellenőrző vizsgálatokhoz, függ a részminták méretétől, az analízishez használt másolati minták számától, valamint a mintavételek várható maximális számától. A részminták vétele előtt az ömlesztve inkubált talajokat alaposan össze kell keverni. Ha a talajok inkubálása önálló részminták sorozataként történik, az egyes kezelt és nem kezelt ömlesztett talajmintákat a szükséges számú részmintára kell felosztani, amelyeket azután igény szerint kell felhasználni. Olyan kísérleteknél, amikor várhatóan több mint két alkalommal kell majd mintát venni, elegendő számú részmintát kell készíteni ahhoz, hogy azokból minden másolati mintára és mintavételi alkalomra jusson. A tesztalajokat legalább három másolati mintában kell aerob körülmények között inkubálni (lásd az 1.7.1.1. szakaszt). Minden egyes vizsgálat során megfelelő göztérrel rendelkező edényeket kell használni annak érdekében, hogy ne alakuljanak ki anaerob körülmények. Illékony anyagok vizsgálata esetén a vizsgálatot csak egy önálló részmintákból álló sorozattal kell elvégezni.

1.7.1.3. A kísérlet körülményei és időtartama

A vizsgálatot sötétben, 20 ± 2 °C-os szobahőmérsékleten kell elvégezni. A talajmintákat a vizsgálat időtartama alatt a talaj maximális víztartó kapacitásának 40 és 60 százaléka közötti értéken kell tartani (lásd az 1.6.4.2. szakaszt) ± 5%-os eltéréssel. Szükség esetén desztillált vagy ioncserélt víz adható a mintákhoz.

A vizsgálat minimális időtartama 28 nap. Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén össze kell hasonlítani a kezelt és az ellenőrző mintákban felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén mennyiségét. Ha a 28. napon ezek több mint 25%-kal eltérnek egymástól, a vizsgálatot addig kell folytatni, amíg a különbség 25%-ra vagy az alá nem csökken, vagy legfeljebb 100 napig, ha az a korábbi időpont. Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a vizsgálat a 28. nap után véget ér. A 28. napon meg kell határozni a kezelt és az ellenőrző talajmintákban felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén mennyiségét, és ki kell számítani az EC_x-értékeket.

1.7.2. Mintavétel és a talajok elemzése

1.7.2.1. Talajminta-vételi program

Mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén a 0., 7., 14. és 28. napon meg kell mérni a talajmintákban a glükózindukált légzési sebességeket. Ha hosszabb időtartamú vizsgálatot kell végezni, a további méréseket a 28. nap után 14 naponta kell végezni.

Nem mezőgazdasági vegyi anyagok vizsgálata esetén legalább öt vizsgálati koncentrációt kell alkalmazni, és a talajminták glükózindukált légzését az expozíciós időszak kezdetén (0. nap) és végén (28. nap) kell megmérni. Szükség esetén be lehet iktatni egy köztes mérést is, például a 7. napon. A 28. napon kapott adatokból meg kell határozni a vegyi anyag EC_x -értékét. Szükség esetén a 0. napon az ellenőrző mintákban mért adatok segítségével meg lehet becsülni, hogy a talajban eredetileg milyen mennyiségben volt jelen metabolikusan aktív mikrobiális biomassa (12).

1.7.2.2. A glükózindukált légzési sebesség mérése

Minden mintavételi időpontban meg kell határozni az egyes kezelt és ellenőrző másolati mintákban tapasztalható glükózindukált légzési sebességet. A talajmintákhoz olyan mennyiségű glükózt kell keverni, hogy az azonnali maximális légzési választ váltson ki. Az adott talajban a maximális válasz kiváltásához szükséges glükózmennyiséget előzetes vizsgálatokkal lehet meghatározni, amelyhez egy sor különböző glükózkoncentrációt kell alkalmazni (14). A 0,5–1,5% szerves szént tartalmazó homokos talajok esetében azonban általában elegendő, ha 2000–2000 mg/kg száraztalaj mennyiségben adunk hozzá glükózt. A glükóz tiszta kvarchomokkal [10 g homok/kg száraztalaj] porrá őrlhető és homogén módon a talajhoz keverhető.

A glükózzal feljavított talajmintákat a légzési sebességet folyamatosan, óránként vagy kétóránként mérő, megfelelő berendezésben (lásd az 1.6.1 szakaszt), 20 ± 2 °C-on inkubálni kell. A felszabaduló szén-dioxidot vagy elfogyasztott oxigént 12 órán át folyamatosan mérni kell, és a mérést a lehető leghamarabb, azaz a glükóz hozzáadása után 1–2 órán belül el kell kezdeni. Meg kell mérni a 12 óra alatt felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén teljes mennyiségét, és ebből meg kell határozni a közepes légzési sebességeket.

2. ADATOK

2.1. Az eredmények kezelése

Mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálat esetén le kell jegyezni az egyes másolati talajmintákban felszabaduló szén-dioxid vagy elfogyasztott oxigén mennyiségét, és a másolati minták átlagát táblázatos formában kell megadni. Az eredményeket megfelelő és általánosan elfogadott statisztikai módszerekkel (például F-teszt, 5%-os szignifikanciaszint) kell kiértékelni. A glükózindukált légzési sebességet mg szén-dioxid/kg száraztalaj/óra vagy mg oxigén/talaj (szárazsúly)/óra egységekben kell kifejezni. Az egyes kezeléseknél mért közepes szén-dioxid képződési vagy közepes oxigénfogyasztási sebességeket össze kell hasonlítani az ellenőrző mintában mérttel, és ki kell számítani az ellenőrző mintától való százalékos eltérést.

Nem mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálat esetén meg kell határozni az egyes másolati mintákban a felszabaduló szén-dioxid vagy az elfogyasztott oxigén mennyiségét, és dózis-válasz görbét kell felvenni az EC_x -értékek becsléséhez. A kezelt mintákban 28 nap után mért glükózindukált légzési sebességeket [mg szén-dioxid/kg száraztalaj/óra vagy mg oxigén/talaj (szárazsúly)/óra] össze kell hasonlítani az ellenőrző mintákban mérttel. Ezekből az adatokból ki kell számítani az egyes vizsgálati koncentrációkra vonatkozó %-os gátlási értékeket. A százalékos értékeket a koncentráció függvényében kell ábrázolni, majd statisztikai eljárások alkalmazásával ki kell számítani az EC_x -értékeket. A számított EC_x -értékek konfidenciahatárát ($p = 0,95$) is a szabványos eljárások segítségével kell meghatározni (15) (16) (17).

2.2. Az eredmények értelmezése

Ha a mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálatok eredményeinek értékelésekor az alacsonyabb koncentrációjú kezeléssel (azaz a maximális becsült koncentrációval) és az ellenőrző mintákkal kapott légzési sebességek különbsége a 28. nap utáni mintavételi időpontok valamelyikénél nem haladja meg a 25%-ot, akkor azt a következtetést kell levonni, hogy a terméknek nincs hosszú távú hatása a talajokban folyó szénátalakításra. A nem mezőgazdasági vegyi anyagokkal végzett vizsgálatok esetében a vegyületek értékeléséhez az EC_{50} -, EC_{25} - és/vagy EC_{10} -értékeket kell használni.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következő információkat kell tartalmaznia:

a talaj teljes körű azonosítása, ezen belül:

- a terület földrajzi meghatározása (földrajzi hosszúság és szélesség);
- a terület történetével kapcsolatos információk (növénytakaró, növényvédő szerekkel való kezelés, műtrágyázás, véletlen szennyezések stb.);

- földhasználat (például mezőgazdasági talaj, erdő stb.);
- a mintavétel mélysége (cm);
- homok-/iszap-/agyagtartalom (% szárazsúly);
- pH (vízben);
- szervesszén-tartalom (% szárazsúly);
- nitrogéntartalom (% szárazsúly);
- kationcserélő kapacitás (mmol/kg);
- kiindulási mikrobiális biotartalom a teljes szervesszén-tartalom százalékában kifejezve;
- hivatkozások az egyes paraméterek meghatározásához alkalmazott módszerekre;
- a talajminták gyűjtésével és tárolásával kapcsolatos minden információ;
- adott esetben a talaj előinkubálásával kapcsolatos részletek.

Vizsgálandó anyag:

- fizikai jelleg és adott esetben fizikai-kémiai tulajdonságok;
- kémiai azonosító adatok és ezen belül adott esetben a szerkezeti képlet, tisztaság (növényvédő szerek esetében az aktív összetevő százalékos aránya), nitrogéntartalom.

Vizsgálati körülmények:

- a talaj szerves szubsztráttal való javításának részletei;
- a vizsgálandó vegyi anyag alkalmazott koncentrációinak száma és adott esetben a koncentrációk megválasztásának indoklása;
- a vizsgálandó anyag talajon való alkalmazásának részletei;
- inkubálási hőmérséklet;
- a talaj nedvességtartalma a vizsgálat kezdetén és a vizsgálat alatt;
- az alkalmazott talajinkubálási módszer (ömlesztett minták vagy önálló részminták sorozata);
- másolati minták száma;
- mintavételi időpontok.

Eredmények:

- a légzési sebesség mérésére alkalmazott módszer és berendezés;
- táblázatos formában megadott adatok, ezen belül a szén-dioxid vagy oxigén mennyiségek egyedi és átlagértékei;
- a másolati minták közötti eltérések a kezelt és ellenőrző mintákban;
- adott esetben a számításoknál alkalmazott korrekciók magyarázata;
- az egyes mintavételi időpontokban mért glükózindukált légzési sebességek százalékos eltérése, vagy adott esetben a 95 százalékos konfidenciahatárral meghatározott EC_{50} -érték, a többi EC_x -érték (azaz az EC_{25} vagy az EC_{10}) konfidencia-intervallumokkal, és a dózis-válasz görbe grafikonja;
- adott esetben az eredmények statisztikai kezelése;
- az eredmények értelmezését segítő minden információ és megfigyelés.

4. HIVATKOZÁSOK

(1) EPPO (1994). Decision-Making Scheme for the Environmental Risk Assessment of Plant Protection Chemicals. Chapter 7: Soil Microflora. EPPO Bulletin 24: 1–16, 1994.

(2) BBA (1990). Effects on the Activity of the Soil Microflora. BBA Guidelines for the Official Testing of Plant Protection Products, VI, 1–1 (2nd eds., 1990).

(3) EPA (1987). Soil Microbial Community Toxicity Test. EPA 40 CFR Part 797.3700. Toxic Substances Control Act Test Guidelines; Proposed rule. September 28, 1987.

(4) SETAC-Europe (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides, Ed. M.R. Lynch, Pub. SETAC-Europe, Brussels.

(5) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments, Belgirate, Italy, 18–20 January 1995.

(6) ISO 10381–6 (1993). Soil quality – Sampling. Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory. (Talajminőség – Mintavétel – A mikrobiális folyamatok laboratóriumi értékelésére szolgáló talaj begyűjtésére, kezelésére és tárolására vonatkozó iránymutatás.)

(7) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and Storage of Soils for Pesticide Experiments, in „Pesticide Effects on Soil Microflora”. Eds. L. Somerville and M.P. Greaves, Chap. 3: 45–60.

(8) Anderson, J.P.E. (1982). Soil Respiration, in „Methods of Soil Analysis – Part 2: Chemical and Microbiological Properties”. Agronomy Monograph No° 9. Eds. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeney. 41: 831–871.

(9) ISO 11266–1 (1993). Soil Quality – Guidance on Laboratory Tests for Biodegradation in Soil: Part 1. Aerobic Conditions. (Talajminőség. Útmutató a talajban levő szerves vegyi anyagok aerob feltételek melletti biológiai lebontásának laboratóriumi vizsgálatára.)

(10) ISO 14239 (1997E). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions. (Talajminőség. Laboratóriumi inkubációs rendszerek a talajban lévő szerves vegyi anyagok aerob feltételek mellett végbemenő mineralizációjának vizsgálatához.)

(11) Heinemeyer, O., Insam, H., Kaiser, E.A. and Walenzik, G. (1989). Soil microbial biomass and respiration measurements; an automated technique based on infrared gas analyses. *Plant and Soil*, 116: 77–81.

(12) ISO 14240–1 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 1. rész: Szubsztrátindukált respirációs módszer.)

(13) ISO 14240–2 (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation-extraction method. (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomasszájának meghatározása. 2. rész: Gőzextrakciós módszer.)

(14) Malkomes, H.-P. (1986). Einfluß von Glukosemenge auf die Reaktion der Kurzzeit-Atmung im Boden Gegenüber Pflanzenschutzmitteln, Dargestellt am Beispiel eines Herbizide. (Influence of the Amount of Glucose Added to the Soil on the Effect of Pesticides in Short-Term Respiration, using a Herbicide as an Example). *Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd., Braunschweig*, 38: 113–120.

(15) Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Jour. Pharmacol. and Exper. Ther.*, 96, 99–113.

(16) Finney, D.J. (1971). *Probit Analysis*. 3rd ed., Cambridge, London and New-York.

(17) Finney D.J. (1978). *Statistical Methods in biological Assay*. Griffin, Weycombe, UK.

C.23. AEROB ÉS ANAEROB ÁTALAKÍTÁS A TALAJBAN

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer az OECD TG 307 (2002) módszer megfelelője.

1.1. Bevezetés

Ez a vizsgálati módszer meglévő iránymutatásokon alapul (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9). Az ennél a vizsgálati módszernél ismertetett módszer célja a vegyi anyagok talajban zajló aerob és anaerob átalakításának értékelése. A kísérletek során meghatározható (i) a vizsgálandó anyag átalakulási sebessége, valamint (ii) azon átalakulási termékek jellege, illetve keletkezésének és eltűnésének sebessége, amelyekkel a növények és talajlakó szervezetek kapcsolatba kerülhetnek. Az ilyen vizsgálatokra olyan vegyi anyagok esetében van szükség, amelyeket közvetlenül a talajokra hordanak ki, vagy amelyek valószínűleg bekerülnek a talajkörnyezetbe. Az ilyen laboratóriumi vizsgálatok eredményei a kapcsolódó szántóföldi vizsgálatok mintavételi és elemzési protokolljainak kidolgozásához is felhasználhatók.

Az egy talajtípussal végzett aerob és anaerob vizsgálatok általában elegendőek az átalakítási útvonalak értékeléséhez (8) (10) (11). Az átalakulási sebességeket legalább három további talajban meg kell határozni (8) (10).

Az 1995-ben az olaszországi Belgirateban megrendezett, a talajok/üledékek kiválasztásával kapcsolatos OECD-munkaértekezleten (10) megegyezés született az e vizsgálatban alkalmazandó talajok számáról és típusáról. A vizsgált talajtípusoknak reprezentatívnak kell lenniük azon környezeti feltételek vonatkozásában, ahol a használat vagy kibocsátás történik. Azokat a vegyi anyagokat például, amelyek kibocsátása a szubtrópusi-trópusi éghajlaton történhet, Ferrasol vagy Nitosol (FAO-rendszer) talajokkal kell vizsgálni. A munkaértekezleten az ISO Útmutató (15) alapján ajánlásokat fogalmaztak meg a talajminták gyűjtésével, kezelésével és tárolásával kapcsolatosan is. Ennél a módszernél esik szó a rizistalajok alkalmazásáról is.

1.2. Fogalommeghatározások

»Vizsgálandó anyag«: bármely anyag, legyen az a kiindulási vegyület, vagy megfelelő átalakulási termék.

»Átalakulási termékek«: minden olyan anyag, amely a vizsgálandó anyag biotikus vagy abiotikus átalakulási reakciói nyomán keletkezik, beleértve a CO₂-t, illetve a megkötött maradványokban lévő összes termék.

»Megkötött maradványok«: A »megkötött maradványok« a talajban, növényekben vagy állatokban jelen lévő olyan vegyületek, amelyek a kiindulási vegyület vagy annak anyagszerterméke(i)/átalakulási termékei formájában extrahálás után is a mátrixban maradnak. Az extrakciós módszer alapján véve nem változtathatja meg magukat a vegyületeket

vagy a mátrix szerkezetét. A kötés jellege részben mátrixmódosító extrakciós módszerek, valamint kifinomult analitikai technikák segítségével tisztázható. Ez idáig kovalens, ionos és szorpciós kötéseket, valamint bezáródásokat azonosítottak ilyen módon. A megkötött maradványok létrejötte általánosságban szignifikánsan csökkenti a biológiai elérhetőséget és biológiai hozzáférhetőséget (12) [az IUPAC 1984-ben módosította (13)].

»*Aerob átalakulás*«: molekuláris oxigén jelenlétében végbemenő reakciók (14).

»*Anaerob átalakulás*«: molekuláris oxigén kizárásával végbemenő reakciók (14).

»*Talaj*«: ásványi és szerves kémiai komponensek keveréke, amelyek közül az utóbbiak magas szén- és nitrogéntartalmú, valamint nagy molekulásúlyú vegyületek, amelyeket apró élő szervezetek (főleg mikroorganizmusok) népesítenek be. A talajok kétféle állapotban kezelhetők:

a) érintetlen talajok, különféle talajtípusok jellegzetes rétegződésével, ahogy azok a múltban kialakultak;

b) megbolygatott talajok, például ahogy általában szántóföldeken található, vagy amikor ásással mintákat vesznek belőlük és e vizsgálati módszer céljára azokat felhasználják (14).

»*Mineralizáció*«: a szerves vegyületek teljes mértékű lebomlása aerob körülmények között CO_2 -vé és H_2O -vá, illetve anaerob körülmények között CH_4 -gyé, CO_2 -vé és H_2O -vá. E vizsgálati módszer vonatkozásában a ^{14}C -jelölt vegyületek alkalmazásakor a mineralizáció kiterjedt lebomlást jelent, amelynek során egy jelölt szénatom oxidálódik, és megfelelő mennyiségű $^{14}\text{CO}_2$ szabadul fel (14).

»*Felezési idő*«: $t_{0,5}$, a vizsgálandó anyag 50%-ának átalakulásához szükséges idő, ha az átalakulás elsőrendű kinetikával leírható; a felezési idő független a koncentrációtól.

» *DT_{50} (lebomlási idő 50)*«: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag koncentrációja 50%-kal csökken; akkor nem azonos a felezési idővel ($t_{0,5}$), ha az átalakulás nem elsőrendű kinetikát követ.

» *DT_{75} (lebomlási idő 75)*«: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag koncentrációja 75%-kal csökken.

» *DT_{90} (lebomlási idő 90)*«: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag koncentrációja 90%-kal csökken.

1.3. Referenciaanyagok

Az átalakulási termékek spektroszkópiás és kromatográfias módszerekkel történő jellemzéséhez és/vagy azonosításához referenciaanyagokat kell alkalmazni.

1.4. A vizsgálat alkalmazhatósága

A módszer minden vegyi anyaghoz alkalmazható (legyen az nem jelölt vagy jelölt anyag), amelyhez létezik kielégítően pontos és érzékeny analitikai módszer. Enyhén illékony, nem illékony, vízben oldható és vízben nem oldható vegyületekhez is alkalmazható. A vizsgálat nem alkalmazható olyan vegyi anyagokra, amelyek a talajban nagymértékben illékonyak (például gáz alakú növényvédő szerek, szerves oldószerek), és ezért nem lehet őket a vizsgálat kísérleti körülményei között a talajban tartani.

1.5. A vizsgálandó anyaggal kapcsolatos információk

Az átalakulás sebességének mérésére nem jelölt vagy jelölt vizsgálandó anyag is alkalmazható. Jelölt anyagra olyankor van szükség, ha az átalakulás útvonalait kívánjuk tanulmányozni vagy anyagmérleget kívánunk felállítani. A ^{14}C -jelölés az ajánlott, de más izotópok, így például ^{13}C , ^{15}N , ^3H vagy ^{32}P is alkalmazható. Amennyire csak lehetséges, a jelölést a molekula legstabilabb részén vagy részein kell elhelyezni¹. A vizsgálandó anyagnak legalább 95%-os tisztaságúnak kell lennie.

A talajban zajló aerob és anaerob átalakulás vizsgálatának elvégzése előtt a vizsgálandó anyaggal kapcsolatban az alábbi információkkal kell rendelkezni:

a) oldhatóság vízben (A6. módszer);

b) oldhatóság szerves oldószerekben;

c) gőznyomás (A4. módszer) és Henry-törvény állandó;

d) n-oktanol/víz megoszlási hányados (A8. módszer);

e) kémiai stabilitás sötétben (hidrolízis) (C7. módszer);

f) pK_a , ha valamelyik molekula hajlamos a protonálódásra vagy deprotonálódásra [112. számú OECD Iránymutatás] (16).

¹ Ha a vizsgálandó anyag például egy gyűrűt tartalmaz, akkor ezt a gyűrűt kell megjelölni; ha a vizsgálandó anyag két vagy több gyűrűt is tartalmaz, külön vizsgálatokra lehet szükség az egyes jelölt gyűrűk sorsának megismeréséhez, illetve az átalakulási termékek keletkezésével kapcsolatos információk összegyűjtéséhez.

További hasznos információk lehetnek a vizsgálandó anyagnak a talajlakó mikroorganizmusokra gyakorolt toxicitásával kapcsolatos adatok [C21. és C22. vizsgálati módszer] (16).

A vizsgálandó anyagok és átalakulási termékeik mennyiségi és minőségi meghatározására szolgáló analitikai módszereknek (köztük az extrakciós és gázleköltő módszereknek) rendelkezésre kell állniuk.

1.6. A vizsgálati módszer elve

Talajmintákat a vizsgálandó anyaggal kell kezelni, és ellenőrzött laboratóriumi körülmények között (állandó hőmérséklet és talajnedvesség) sötétben, biométer-típusú lombikban vagy átfolyós rendszerekben inkubálni kell őket. Megfelelő időközönként talajmintákat kell venni, amelyekben extrahálás után meg kell határozni a vizsgálandó anyagot, illetve az átalakulási termékeket. Megfelelő adszorpciós eszközök segítségével illékony termékek is gyűjthetők elemzés céljára. ^{14}C -jelölt anyagok alkalmazásával, a fejlődő $^{14}\text{CO}_2$ befogása után megmérhetők a vizsgálandó anyag különféle mineralizációs sebességei, és megállapítható az anyagmérleg, ezen belül a lekötött maradványok képződése is.

1.7. Minőségi követelmények

1.7.1. Visszanyerés

A vizsgálandó anyag hozzáadása után azonnal legalább két másolati talajmintát elemezve megkaphatók az analitikai módszer ismételhetőségével és a vizsgálandó anyag alkalmazására szolgáló eljárás egységességével kapcsolatos első információk. A kísérletek későbbi szakaszában a visszanyeréseket a vonatkozó anyagmérlegek adják. A visszanyeréseknek jelölt vegyületek esetében 90% és 110% között (8), nem jelölt vegyületek esetében pedig 70% és 110% között (3) kell mozogniuk.

1.7.2. Az analitikai módszer megismételhetősége és érzékenysége

A vizsgálandó anyag és átalakulási termékei mennyiségi meghatározása vonatkozásában (a kiindulási extrakciós hatékonyság kivételével) az analitikai módszer megismételhetősége az átalakulási termékek megjelenéséhez elegendő ideig történő inkubálás után ugyanannak a talajkivonatnak két másolati mintában történő mérésével ellenőrizhető.

Az adott vizsgálandó anyagra és átalakulási termékeire az analitikai módszer kimutathatósági határértékének (LOD) legalább $0,01 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ talaj (mint vizsgálandó anyag), vagy – ha az a kisebb – az alkalmazott dózis 1%-ának kell lennie. Meg kell határozni továbbá a mennyiségi meghatározás határértékét (LOQ) is.

1.7.3. Az átalakulási adatok pontossága

Ha a vizsgálandó anyag koncentrációját az idő függvényében regressziós analízisnek vetik alá, akkor megfelelő információk nyerhetők az átalakulási görbe megbízhatóságáról, és lehetővé válik a konfidenciahatárok kiszámítása a felezési időkhöz (pszeudo-elsőrendű kinetika esetén) vagy a DT_{50} -értékekhez, illetve adott esetben a DT_{75} - és DT_{90} -értékekhez is.

1.8. A vizsgálati módszer leírása

1.8.1. Berendezés és reagensek

Az inkubálórendszerek statikus, zárt rendszerekből vagy megfelelő átfolyós rendszerekből állnak (7) (17). Megfelelő átfolyós talajinkubáló berendezésekre és biométer-típusú lombikokra az 1., illetve 2. ábrán láthatók példák. Mindkét inkubáló-rendszernek megvannak az előnyei és korlátai (7) (17).

Szabványos laboratóriumi eszközökre van szükség, különösen a következőkre:

- analitikai műszerek, például GLC-, HPLC-, TLC-berendezés, ezen belül a radioaktívan jelölt vagy nem jelölt anyagok analízisére vagy a fordított izotóphígítási módszerhez alkalmazható megfelelő detektáló rendszerek;
- minőségi meghatározásra alkalmazható műszerek (például MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR stb.);
- folyadékszintillációs számláló;
- oxidálószer a radioaktív anyagok elégetéséhez;
- centrifuga;
- extrakciós készülék (például centrifugacsövek hideg extraháláshoz és Soxhlet-készülék reflux alatt végzett folytonos extraháláshoz);
- oldatok és kivonatok töményítésére szolgáló berendezések (pl. rotációs evaporátor);
- vízfürdő;
- mechanikai keverőeszközök (pl. dagasztógép, rotációs keverő).

Az alkalmazott kémiai reagensek például az alábbiak:

- NaOH, analitikai minőségű, 2 mol dm^{-3} , vagy más megfelelő bázis (pl. KOH, etanolamin);
- H_2SO_4 , analitikai minőségű, $0,05 \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$;
- etilén-glikol, analitikai minőségű;
- szilárd adszorpciós anyagok, például nátronmész és poliuretán dugók;
- szerves oldószerek, analitikai minőségű, például aceton, metanol stb.;
- szcintillációs folyadék.

1.8.2. A vizsgálandó anyag alkalmazása

A vizsgálandó anyag talajhoz adásához és abban történő elosztatásához azt először fel kell oldani (ioncserélt vagy desztillált) vízben vagy ha szükséges, minimális mennyiségű acetonban vagy más szerves oldószerben (6), amelyben a vizsgálandó anyag kellően oldható és stabil. A kiválasztott oldószer mennyisége azonban nem gyakorolhat szignifikáns hatásokat a talaj mikrobiális aktivitására (lásd az 1.5. és az 1.9.2.–1.9.3. szakaszt). Kerülni kell az olyan oldószerek, például a kloroform, a diklór-metán és egyéb halogénezett oldószerek alkalmazását, amelyek gátolják a mikrobiális aktivitást.

A vizsgálandó anyag szilárd formában, például kvarchomokkal keverve (6) vagy elég száraz és sterilizett, kis térfogatú tesztalaj-rézmintában is a talajhoz adható. Ha a vizsgálandó anyagot oldószer alkalmazásával adjuk a talajhoz, az oldószernek el kell párolognia a vizsgálandó anyaggal kezelt rézminta eredeti, nem steril talajmintához történő hozzáadása előtt.

Általános vegyi anyagok esetében, amelyeknél a talajba való bejutás fő útvonala a szennyvíziszap vagy a mezőgazdasági tevékenységek, a vizsgálandó anyagot először iszaphoz kell keverni, és ebben a formában kell a talajmintába juttatni (lásd az 1.9.2. és az 1.9.3. szakaszt).

A formulázott termékek alkalmazása általában nem ajánlott. A rosszul oldódó vizsgálandó anyagok esetében azonban megfelelő alternatíva lehet a formulázott anyag alkalmazása.

1.8.3. Talajok

1.8.3.1. A talaj kiválasztása

Az átalakulási útvonal meghatározásához reprezentatív talajok alkalmazhatók, így például ajánlott az olyan homokos vályog vagy iszapos vályog vagy vályog, vagy a vályogos homok [a FAO és az USDA osztályozása szerint (18)], amelynek pH-ja 5,5 és 8,0 közötti, szerveszén-tartalma 0,5–2,5%, mikrobiális biomaszája pedig legalább a teljes szerveszén-tartalom 1%-ának megfelelő (10).

Az átalakulási sebesség vizsgálatokhoz legalább három további olyan talajt kell alkalmazni, amelyek jól reprezentálnak egy sor megfelelő talajtípust. A különféle talajokban eltérőnek kell lenniük a szerveszén-tartalom, a pH, az agyagtartalom és a mikrobiális biomasza értékeinek.

A talajokat legalább a szerkezet (%homok, %iszap, %agyag) [a FAO és az USDA osztályozása szerint (18)], a pH, a kationcserélő kapacitás, a szerves szén, a térfogatsűrűség, a vízvisszatartási jellemzők² és mikrobiális biomasza (csak az aerob vizsgálatokhoz) szempontjából jellemezni kell. Az eredmények értelmezéséhez hasznosak lehetnek a talajok tulajdonságaival kapcsolatos további információk is. A talajok jellemzőinek meghatározására a (19) (20) (21) (22) és (23) hivatkozásban ajánlott módszerek alkalmazhatók. A mikrobiális biomaszt a szubsztrátindukált légzési (SIR) módszerrel (25) (26) vagy alternatív módszerekkel (20) kell meghatározni.

1.8.3.2. A talajok gyűjtése, kezelése és tárolása

Részletes információkkal kell rendelkezni annak a szántóföldi területnek a történetéről, ahonnan a vizsgálati talajminta begyűjtése történik. Ilyen részletek például a pontos hely, a növénytakaró, a növényvédő szerekkel végzett kezelések, a szerves és szervesetlen trágyákkal végzett kezelések, a biológiai anyagok hozzáadása vagy egyéb szennyezések. Nem alkalmazhatók átalakulási vizsgálatokhoz olyan talajok, amelyeket az elmúlt négy évben a vizsgálandó anyaggal vagy szerkezeti analógjaival kezeltek (10) (15).

A talajt frissen kell begyűjteni a területről (az A-rétegből vagy a felső 20 cm-es rétegből) a benne lévő talajnedvességgel együtt, amely megkönnyíti a szitálást. A rizsföldekről származó talajok kivételével kerülni kell a mintavételt a hosszabb (> 30 napos) szárazságok, fagyok vagy áradások idején vagy közvetlenül ezek után (14). A mintákat úgy kell szállítani, hogy közben minimális legyen a talaj víztartalmának változása, és – lehetőség szerint – sötétben kell tartani, illetve biztosítani kell a szabad levegőbeáramlást. Erre a célra általában megfelel egy lazán összekötött polietilén zsák.

A talajt a mintavételt követően a lehető leggyorsabban fel kell dolgozni. El kell távolítani belőle a növényi részeket, a nagyobb méretű talajfaunát és a köveket, majd 2 mm-es szitán át kell szitálni, ami eltávolítja a kisebb köveket, az állati és növényi törmeléket is. A szitálás előtt meg kell akadályozni a talaj erőteljes kiszáradását és összepréselődését (15).

² A talajok vízvisszatartási jellemzői mérhetők szántóföldi kapacitásként, vízmegtartó kapacitásként vagy vízszívó erőként (pF). A magyarázatokat lásd az 1. mellékletben. A vizsgálati jelentésben ki kell térni arra, hogy a talajok vízvisszatartási jellemzőit és térfogatsűrűségét érintetlen szántóföldi mintákban vagy megbolygatott (feldolgozott) mintákban mérték-e.

Ha a téli időszakban (a talaj fagyottsága vagy a hótakaró miatt) nehézkessé válik a mintavétel, akkor üvegházban, növénytakaró (pl. fű vagy fű/lóhere keverék) alatt tárolt készletekből is vehető talajminta. A frissen gyűjtött talajokon végzett vizsgálatok a legelőnyösebbek, de ha a begyűjtött és feldolgozott talajt a vizsgálatok megkezdése előtt tárolni kell, akkor a mikrobiális aktivitás megőrzése érdekében ez csak megfelelő körülmények között és csak korlátozott ideig (4 ± 2 °C-on legfeljebb három hónapig) megengedett³. A biológiai átalakulási kísérletekhez alkalmazott talajok begyűjtésével, kezelésével és tárolásával kapcsolatos részletes instrukciók a (8) (10) (15) (26) és (27) hivatkozásban találhatóak.

Mielőtt a feldolgozott talaj felhasználásra kerülne ehhez a vizsgálatához, a mintákat elő kell inkubálni a csírázás lehetővé tétele és a magok eltávolítása, valamint a mikrobiális anyagcsere-egyensúlynak a mintavételi vagy tárolási körülményekről az inkubációs körülményekre való átállást követően történő helyreállítása érdekében. Általában megfelelő, ha az előinkubálást 2–28 napig végezzük olyan hőmérsékleten és olyan nedvesség mellett, amely nagyjából megközelíti a vizsgálati körülményekre jellemző viszonyokat (15). A tárolás és előinkubálás együttes időtartama nem haladhatja meg a három hónapot.

1.9. A vizsgálat végrehajtása

1.9.1. Vizsgálati körülmények

1.9.1.1. Vizsgálati hőmérséklet

A talajokat a vizsgálat teljes időtartama alatt sötétben és olyan állandó hőmérsékleten kell inkubálni, amely reprezentatív a használat vagy kibocsátás területén uralkodó éghajlati viszonyokra. Az ajánlott hőmérséklet minden olyan vizsgálandó anyag esetében 20 ± 2 °C, amelyek mérsékelt éghajlaton bejuthatnak a talajba. A hőmérsékletet nyomon kell követni.

A hidegebb éghajlatokon (pl. az északi országokban vagy az őszi-téli időszakban) alkalmazott vagy kibocsátott anyagok esetében további talajmintákat is inkubálni kell, de alacsonyabb hőmérsékleten (pl. 10 ± 2 °C).

1.9.1.2. Nedvességtartalom

Az aerob körülmények között végzett átalakulási vizsgálatok esetében a talaj nedvességtartalmát⁴ úgy kell beállítani, hogy a pF-értéket 2,0 és 2,5 között tartsuk (3). A talaj nedvességtartalmát víztömeg / száraz talaj tömeg egységben kell kifejezni, és rendszeresen ellenőrizni kell (például 2 hetente) inkubációs lombik tömegének megmérésével, és a vízvesztesség víz (lehetőleg steriliszűrt csapvíz) hozzáadásával történő kompenzálásával. Figyelni kell arra, hogy a víz hozzáadásakor megakadályozzuk vagy minimálisra csökkentjük a vizsgálandó anyag és/vagy az átalakulási termékek párolgási és/vagy esetleges fotodegradációs veszteségeit.

Az anaerob vagy rizsföldi körülmények között végzett átalakulási vizsgálatoknál a talajt elárasztással kell víztelítettné tenni.

1.9.1.3. Aerob inkubációs körülmények

Az átfolyós rendszerekben az aerob körülményeket a rendszer időről időre vízzel történő átöblítésével vagy nedves levegő folyamatos átfűvésével kell fenntartani. A biométer lombikokban a légcserét diffúzió segítségével kell fenntartani.

1.9.1.4. Steril aerob körülmények

A vizsgálandó anyag abiotikus átalakulásának jelentőségével kapcsolatban úgy nyerhetők információk, hogy a mintákat sterilizzuk [a sterilizációs módszereket lásd a (16) és (29) hivatkozásban], hozzáadjuk a steril vizsgálandó anyagot (például az oldat steriliszűrőn keresztül történő hozzáadásával) és nedves levegővel átszellőztetjük, az 1.9.1.3. szakaszban leírtak szerint. A rizstalajok esetében a talajt és a vizet sterilizálni kell, az inkubálást pedig az 1.9.1.6. szakaszban leírtak szerint kell végezni.

³ A legfrissebb kutatási eredmények szerint -20 °C-on a mérsékelt éghajlatról származó talajok három hónapnál tovább is eltarthatók (28) (29) anélkül, hogy szignifikánsan csökkenne a mikrobiális aktivitás.

⁴ A talaj nem lehet sem túl nedves, sem túl száraz annak érdekében, hogy fenntartható legyen a talaj mikroflórájának megfelelő szellőzése és tápanyagellátása. Az optimális mikrobanövekedéshez az ajánlott nedvességtartalom a víztartó képesség (WHC) 40 és 60%-a között, illetve 0,1 és 0,33 bar között mozog (6). Ez utóbbi tartomány pF 2,0–2,5-nek felel meg. A különböző talajtípusok tipikus nedvességtartalma a 2. mellékletben található.

1.9.1.5. Anaerob inkubációs körülmények

Anaerob körülmények kialakításához és fenntartásához a vizsgálandó anyaggal kezelt és 30 napig vagy egy felezési időig vagy egy DT_{50} -ig (amelyik a három közül a legrövidebb) aerob körülmények között inkubált talajt vízzel kell elárasztani (1–3 cm-es vízréteg), az inkubációs rendszert pedig inert gázzal (például nitrogénnel vagy argonnal) kell átöblíteni⁵. A vizsgálati rendszernek lehetővé kell tennie a különféle méréseket, így például a pH, az oxigénkoncentráció és a redoxpotenciál meghatározását, továbbá csapadékot is tartalmaznia kell az illékony termékek befogására. A biometér-típusú rendszert le kell zárni a levegő diffúzióval történő bejutásának megakadályozása érdekében.

1.9.1.6. Rizstalajok inkubációs körülményei

A rizstalajokban végbemenő átalakulások tanulmányozására a talajt körülbelül 1–5 cm vízréteggel kell elárasztani, majd a vizsgálandó anyagot a vízfázisba kell juttatni (9). Javasolt legalább 5 cm mélységű talajréteg alkalmazása. A rendszer levegővel átszellőztetett, ugyanúgy, mint az aerob feltételek esetén. Nyomon kell követni, és rögzíteni kell a vizes réteg pH-ját, oxigénkoncentrációját és redoxpotenciálját. Az átalakulási vizsgálatok megkezdése előtt legalább kéthetes előinkubálási időszakra van szükség (lásd az 1.8.3.2. szakaszt).

1.9.1.7. A vizsgálat időtartama

A sebesség- és útvonalvizsgálatok időtartama általában nem haladhatja meg a 120 napot⁶ (3) (6) (8), mivel azt követően egy, a természetes utánpótlástól izolált mesterséges laboratóriumi rendszerben idővel a talaj mikrobiális aktivitásának csökkenése lenne várható. Ahol az a vizsgálandó anyag csökkenésének, valamint a fő átalakulási termékek képződésének és csökkenésének jellemzéséhez szükséges, a vizsgálatok meghosszabbíthatók (például 6 vagy 12 hónapra) (8). A hosszabb inkubációs időtartamokat a vizsgálati jelentésben meg kell indokolni, és csatolni kell az ilyen hosszabb időtartamok során és végén elvégzett biomasszamérések eredményeit is.

1.9.2. A vizsgálat végrehajtása

Minden inkubációs lombikba (lásd a 3. melléklet 1. és 2. ábráját) körülbelül 50–200 g talajt (szárazsúlyra vetítve) kell behelyezni, majd azt az 1.8.2. szakaszban leírt módszerek egyikének alkalmazásával a vizsgálandó anyaggal kell kezelni. Ha a vizsgálandó anyag alkalmazásához szerves oldószert használunk, azt párologtatással el kell távolítani a talajból. A talajt ezután spatulával és/vagy a lombik rázogatójával alaposan össze kell keverni. Ha a vizsgálatot rizsföldi körülmények között végezzük, a talajt és a vizet a vizsgálandó anyag alkalmazása után alaposan össze kell keverni. A kezelt talajok kis részleteiben (pl. 1–1 g-jában) meg kell határozni a vizsgálandó anyag mennyiségét az egyenletes eloszlás ellenőrzése érdekében. Az ezt kiváltó alternatív módszert lásd lent.

A kezelési aránynak meg kell felelnie az adott növényvédő szer legmagasabb, a használati utasításban javasolt alkalmazási arányának, és a terepen megfelelő talajmélységig (például a talaj felső 10 cm-es rétege⁷) egységes beépülést kell biztosítani. A talajba való beépülés nélkül csak a levélzetre vagy a talajra alkalmazott vegyületek esetében például 2,5 cm a megfelelő mélység annak kiszámításához, hogy mennyi vegyületet kell az egyes lombikokba bejuttatni. A talajba beépülő vegyületek esetében a megfelelő mélység a használati utasításban megadott beépülési mélység. Általános vegyi anyagok esetében az alkalmazási arányt az alapján kell megbecsülni, hogy melyik a legjellemzőbb bejutási útvonal; ha a talajba jutás fő útvonala például a szennyvíziszap, a vegyületet olyan koncentrációban kell az iszapba bejuttatni, amely tükrözi az iszapban várható koncentrációt, és a talajhoz adandó iszap mennyiségének tükröznie kell a mezőgazdasági talajok normál iszapterhelését. Ha ez a koncentráció nem elég magas a fő átalakulási termékek azonosításához, hasznos lehet külön talajminták nagyobb koncentrációkkal történő inkubálása, de kerülni kell a talaj mikrobiális funkcióját befolyásoló túlzott mennyiségeket (lásd az 1.5. és az 1.8.2. szakaszt).

⁵ A feltalajokban túlnyomóan aerob viszonyok uralkodnak és ugyanígy a felszínalatti talajokban is, ahogyan azt egy, az Európai Unió által szponzorált kutatási program [K. Takagi et al. (1992). Microbial diversity and activity in subsoils: Methods, field site, seasonal variation in subsoil temperatures and oxygen contents. Proc. Internat. Symp. Environm. Aspects Pesticides Microbiol., 270–277, 17–21 August 1992, Sigtuna, Sweden] is igazolta. Anaerob feltételek csak alkalomszerűen, a talajok erős esőzések utáni elárasztásakor alakulnak ki, illetve amikor a rizsföldeket elárasztják.

⁶ Az aerob vizsgálatokat jóval a 120. nap előtt is be lehet fejezni, ha addigra egyértelműen elértük a végleges átalakítási útvonalat és a teljes mineralizációt. A vizsgálat 120 napon túl is befejezhető, illetve akkor is, ha a vizsgálandó anyag legalább 90%-a átalakult, de csak akkor, ha már legalább 5% CO_2 képződött.

⁷ A kiindulási koncentráció területi alapon történő kiszámítása a következő egyenlet segítségével:

$$C_{\text{soil}} \text{ mg / kg}_{\text{soil}} = \frac{A \text{ kg / ha} \quad 10^6 \text{ mg / kg}}{1 \text{ m} \quad 10^4 \text{ m}^2 / \text{ha} \quad d \text{ kg}_{\text{soil}} / \text{m}^3}$$

$$C_{\text{soil}} = \text{kiindulási koncentráció a talajban [mg} \times \text{kg}^{-1}]$$

$$A = \text{alkalmazási arány [kg} \times \text{ha}^{-1}]; 1 = \text{a szántóföldi talajréteg vastagsága [m]; d = a talaj száraz térfogatsűrűsége [kg} \times \text{m}^{-3}].$$

Általános szabály, hogy az $1 \text{ kg} \times \text{ha}^{-1}$ alkalmazási arány a talaj felső, mintegy 10 cm-es rétegében $1 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ koncentrációt alakít ki (feltéve, hogy a térfogatsűrűség $1 \text{ g} \times \text{cm}^{-3}$).

Vagy nagyobb mennyiségű (1–2 kg) talaj is kezelhető a vizsgálandó anyaggal, megfelelő keverő berendezésben alaposan elkeverve és végül kis, 50–200 g-os részletekben az inkubációs lombikba téve (például mintaosztók segítségével). A kezelt talaj kis (például 1 g-os) részleteiben meg kell határozni a vizsgálandó anyag mennyiségét, így ellenőrizve annak egyenletes talajbeli eloszlását. Az ilyen eljárás azért előnyös, mert lehetővé teszi a vizsgálandó anyag még egyenletesebb eloszlását a talajban.

A nem kezelt talajmintákat is ugyanolyan (aerob) körülmények között kell inkubálni, mint a vizsgálandó anyaggal kezelt mintákat. Ezeket a mintákat a biomasszának a vizsgálat során és végén történő meghatározására kell felhasználni.

Ha a vizsgálandó anyagot szerves oldószer(ek)ben történő feloldás után visszük fel a talajra, az azonos mennyiségű oldószerrel vagy oldószerekkel kezelt talajmintákat ugyanolyan (aerob) körülmények között kell inkubálni, mint a vizsgálandó anyaggal kezelt mintákat. Ezeket a mintákat a vizsgálatok elején, alatt és végén végzett biomasszamérésekhez kell felhasználni, amelyekkel az oldószer(ek)nek a mikrobás biomasszára gyakorolt esetleges hatásai mérhetők fel.

A kezelt talajokat tartalmazó lombikokat vagy az 1. ábrán bemutatott átfolyós rendszerhez kell kapcsolni, vagy a 2. ábrán bemutatott adszorpciós oszloppal kell lezárni (lásd a 3. mellékletet).

1.9.3. Mintavétel és mérés

Megfelelő időközönként párhuzamos inkubációs lombikokat kell eltávolítani, és a talajmintákat megfelelő, különböző polaritású oldószerekkel kell extrahálni, majd meg kell határozni bennük a vizsgálandó anyagot és/vagy az átalakulási termékeket. Egy jól megtervezett vizsgálatban elegendő számú lombikot használunk ahhoz, hogy minden egyes mintavételi időpontban két lombikból tudjunk mérést végezni. Az egyes talajminták inkubálása során és végén különböző időközönként (az első hónapban 7 naponta, majd utána 17 naponta) el kell távolítani az adszorpciós oldatot vagy szilárd adszorpciós anyagot, és meg kell bennük határozni az illékony termékeket. A közvetlenül az alkalmazás után vett talajmintán (0. napi minta) kívül legalább 5 további mintavételi pontot kell beiktatni. Az időközöket úgy kell megválasztani, hogy meghatározható legyen a vizsgálandó anyag csökkenésének mintázata és az átalakulási termékek képződésének és csökkenésének mintázata (például 0., 1., 3., 7. nap; 2, 3 hét; 1, 2, 3 hónap stb.).

¹⁴C-jelölt vizsgálandó anyag alkalmazása esetén a nem extrahálható radioaktivitást égetéssel kell meghatározni, és minden egyes mintavételi intervallumra anyagmérleget kell számítani.

Az anaerob és a rizstalajos inkubálás esetén a talajban és a vizes fázisban együttesen kell meghatározni a vizsgálandó anyagot és az átalakulási termékeket, vagy az extrahálás és mérés előtt szűréssel vagy centrifugálással kell szétválasztani őket.

1.9.4. Opcionális vizsgálatok

A hőmérsékletnek és a talajnedvességnek a vizsgálandó anyag és/vagy átalakulási termékei talajbeli átalakulására gyakorolt hatásának becsléséhez hasznos lehet, ha más hőmérsékleteken és talajnedvességek mellett is végzünk aerob, nem steril vizsgálatokat.

A nem extrahálható radioaktivitás további jellemzése megkísérelhető például szuperkritikus folyadékextrakcióval is.

2. ADATOK

2.1. Az eredmények kezelése

A vizsgálandó anyag, az átalakulási termékek, az illékony anyagok (csak %-osan), és a nem extrahálható rész mennyiségét minden egyes mintavételi intervallumra az alkalmazott kiindulási koncentráció %-ában, illetve adott esetben $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ talaj (szárazsúlyra vetítve) egységben kell megadni. Az alkalmazott kiindulási koncentráció százalékában anyagmérleget is fel kell állítani minden egyes mintavételi intervallumra. A vizsgálandó anyag koncentrációit az idő függvényében ábrázolva megbecsülhető a vizsgálandó anyag átalakulásának felezési ideje vagy DT_{50} -értéke. Meg kell határozni a fő átalakulási termékeket, valamint ezek koncentrációját is fel kell venni az idő függvényében, hogy képződési és csökkenési sebességük megállapítható legyen. Fő átalakulási termék minden olyan termék, amely a vizsgálat során bármikor az alkalmazott dózis legalább 10%-nak megfelelő mennyiségben van jelen.

A befogott illékony termékek is adhatnak némi információt a vizsgálandó anyag és annak átalakulási termékei talajból való elillanási hajlamáról.

A felezési idő vagy DT_{50} -értékek, illetve adott esetben a DT_{75} - és DT_{90} -értékek pontosabb meghatározását megfelelő kinetikai modellszámítások alkalmazásával kell elvégezni. A felezési időt és a DT_{50} -értékeket az alkalmazott modell leírásával, a kinetika rendűségével és a determinációs koefficienssel (r^2) együtt kell a jelentésben feltüntetni. Az elsőrendű kinetikát kell előnyben részesíteni, kivéve, ha $r^2 < 0,7$. Adott esetben a számításokat a fő átalakulási termékekre is alkalmazni kell. A megfelelő modellekre példák a (31)–(35) hivatkozásban találhatók.

A sebességvizsgálatok több különböző hőmérsékleten történő végzése esetén az átalakítási sebességeket kísérleti hőmérséklet tartományon belül a hőmérséklet függvényében kell leírni az alábbi Arrhenius-összefüggés alkalmazásával:

$$k = A e^{-B/T} \text{ vagy } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

ahol $\ln A$ és B az $\ln k$ -nak az $1/T$ függvényében való lineáris regressziójával előállított legjobb illesztésű egyenes tengelymetszetéből és meredekségéből származó regressziós állandók; A a T hőmérsékletnél kapott sebességi állandó; T pedig a hőmérséklet Kelvinben megadva. Ügyelni kell arra, hogy abban az esetben, ha az átalakítást a mikrobiális hatás szabályozza, akkor az Arrhenius-összefüggés csak egy igen korlátozott hőmérsékleti tartományban lesz érvényes.

2.2. Értékelés és az eredmények értelmezése

Bár a vizsgálatokat mesterséges laboratóriumi rendszerekben végezzük, az eredmények lehetővé teszik a vizsgálandó anyagok átalakulási sebességének, valamint az átalakulási termékek képződési és csökkenési sebességének szántóföldi körülmények közötti becslését (36) (37).

A vizsgálandó anyag átalakulási útvonala vizsgálatát információ szolgáltató arról, hogy az alkalmazott anyag szerkezete milyen változásokon megy keresztül a talajban a kémiai és mikrobiális reakciók hatására.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

Vizsgálandó anyag:

- hétköznapi név, kémiai elnevezés, CAS-szám, szerkezeti képlet [radioaktívan jelölt anyagok alkalmazása esetén a jelölés(ek) elhelyezkedése] és a lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok (lásd az 1.5. szakaszt);

- a vizsgálandó anyag tisztasága (szennyezései);

- a jelölt anyagok radiokémiai tisztasága és specifikus aktivitása (adott esetben);

referenciaanyagok:

- az átalakítási termék jellemzésére és/vagy azonosítására alkalmazott referenciaanyagok kémiai elnevezése és szerkezete;

vizsgált talajok:

- a gyűjtés helyével kapcsolatos adatok;
- a talajmintavétel időpontja és az alkalmazott eljárás;
- a talajok tulajdonságai, például a pH, a szervesszén-tartalom, a szerkezet (% homok, % iszap, % agyag), a kationcserélő kapacitás, a térfogatsűrűség, a vízvisszatartási jellemzők, és a mikrobiális biomassza;
- adott esetben a talaj tárolásának időtartama és körülményei;

vizsgálati körülmények:

- a vizsgálatok elvégzésének időpontjai;
- a vizsgálandó anyag alkalmazott mennyisége;
- az alkalmazott oldószerek és a vizsgálandó anyag alkalmazására használt módszer;
- a kezdetben kezelt és az egyes analízisek időpontjában megmintázott talaj tömege;
- az alkalmazott inkubációs rendszer ismertetése;
- légáramsebesség (csak az átfolyós rendszerek esetében);
- a kísérleti rendszer hőmérséklete;
- a talaj nedvességtartalma az inkubálás során;
- mikrobiális biomassza az aerob vizsgálatok kezdetekor, alatt és végén;
- pH, oxigénkoncentráció és redoxpotenciál az anaerob és rizsföldi vizsgálatok kezdetekor, alatt és végén;
- extrakciós módszer(ek);
- a vizsgálandó anyagnak és fontosabb átalakulási termékeinek a talajban és az adszorpciós anyagokban történő mennyiségi és minőségi meghatározására alkalmazott módszerek;
- másolati minták és ellenőrző minták száma.

Eredmények:

- a mikrobiális aktivitás meghatározásának eredményei;
- az alkalmazott analitikai módszerek megismételhetősége és érzékenysége;

- visszanyerési arányok (egy érvényes vizsgálat %-os értékei az 1.7.1. szakaszban vannak feltüntetve);
- az alkalmazott kiindulási dózis %-ában és adott esetben $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ talaj (szárazsúlyra vetítve) egységben is kifejezett eredmények táblázatos összefoglalása;
- anyagmérleg a vizsgálatok közben és végén;
- a nem extrahálható (kötött) talajbeli radioaktivitás vagy maradványok jellemzése;
- a felszabaduló CO_2 és más illékony vegyületek mennyisége;
- a talajbeli koncentráció időbeli függvényének ábrázolása a vizsgálandó anyagra és adott esetben annak fő átalakulási termékeire;
- felezési idő vagy DT_{50} -, DT_{75} - és DT_{90} -értékek a vizsgálandó anyagra és adott esetben annak fő átalakulási termékeire, a konfidenciahatárokkal együtt;
- a steril körülmények közötti abiotikus lebontási sebesség becslése;
- a vizsgálandó anyag és adott esetben annak fő átalakulási termékei átalakulási kinetikájának becslése;
- adott esetben az átalakítás javasolt útvonalai;
- az eredmények tárgyalása és értelmezése;
- nyers adatok (minta kromatogramok, átalakítási sebességek mintaszámításai, és az átalakulási termékek azonosításnak módja).

4. HIVATKOZÁSOK

- (1) US- Environmental Protection Agency (1982). Pesticide Assessment Guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental Fate.
- (2) Agriculture Canada (1987). Environmental Chemistry and Fate. Guidelines for registration of pesticides in Canada.
- (3) Európai Unió (EU) (1995). A Bizottság 1995. július 14-i 95/36/EK irányelve a növényvédő szerek forgalomba hozataláról szóló 91/414/EGK tanácsi irányelv módosításáról. A II. melléklet A. része és III. melléklet A. része: A növényvédő szerek sorsa és viselkedése a környezetben.
- (4) Dutch Commission for Registration of Pesticides (1995). Application for registration of a pesticide. Section G: Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air.
- (5) BBA (1986). Richtlinie für die amtliche Prüfung von Pflanzenschutzmitteln, Teil IV, 4–1. Verbleib von Pflanzenschutzmitteln im Boden – Abbau, Umwandlung und Metabolismus.
- (6) ISO/DIS 11266–1 (1994). Soil Quality -Guidance on laboratory tests for biodegradation of organic chemicals in soil – Part 1 : Aerobic conditions. (Talajminőség. Útmutató a talajban levő szerves vegyi anyagok aerob feltételek melletti biológiai lebonthatóságának laboratóriumi vizsgálatára.)
- (7) ISO 14239 (1997). Soil Quality – Laboratory incubation systems for measuring the mineralization of organic chemicals in soil under aerobic conditions. (Talajminőség. Laboratóriumi inkubációs rendszerek a talajban lévő szerves vegyi anyagok aerob feltételek mellett végbemenő mineralizációjának vizsgálatához)
- (8) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- (9) MAFF – Japan 2000 – Draft Guidelines for transformation studies of pesticides in soil – Aerobic metabolism study in soil under paddy field conditions (flooded).
- (10) OECD (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/Sediments. Belgrate, Italy, 18–20 January 1995.
- (11) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123–157.
- (12) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley – VCH (1998).
- (13) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residue in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945–956 (IUPAC 1984).
- (14) OECD Test Guideline 304 A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- (15) ISO 10381–6 (1993). Soil Quality – Sampling – Part 6: Guidance on the collection, handling and storage of soil for the assessment of aerobic microbial processes in the laboratory. (Talajminőség – Mintavétel – A mikrobiális folyamatok laboratóriumi értékelésére szolgáló talaj begyűjtésére, kezelésére és tárolására vonatkozó iránymutatás.)
- (16) A 67/548/EGK irányelv V. melléklete.

- (17) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In *Progress in Pesticide Biochemistry*. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.
- (18) Soil Texture Classification (US and FAO systems): *Weed Science*, 33, Suppl. 1 (1985) and *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 26:305 (1962).
- (19) *Methods of Soil Analysis* (1986). Part 1, Physical and Mineralogical Methods. A. Klute, Ed.) *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
- (20) *Methods of Soil Analysis* (1982). Part 2, Chemical and Microbiological Properties. A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Kelney, Eds. *Agronomy Series No 9*, 2nd Edition.
- (21) *ISO Standard Compendium Environment* (1994). *Soil Quality – General aspects; chemical and physical methods of analysis; biological methods of analysis*. First Edition.
- (22) Mückenhausen, E. (1975). *Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen*. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.
- (23) Scheffer, F., Schachtschabel, P. (1975). *Lehrbuch der Bodenkunde*. F. Enke Verlag, Stuttgart.
- (24) Anderson, J.P.E., Domsch, K.H. (1978) A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil Biol. Biochem.* 10, 215–221.
- (25) ISO 14240–1 and 2 (1997). *Soil Quality – Determination of soil microbial biomass – Part 1: Substrate-induced respiration method. Part 2: fumigation-extraction method.* (Talajminőség. A talaj mikrobiális biomassájának meghatározása. 1. rész: Szubsztrátindukált respirációs módszer. 2. rész: Gőzextrakciós módszer.)
- (26) Anderson, J.P.E. (1987). Handling and storage of soils for pesticide experiments. In *Pesticide Effects on Soil Microflora*. L. Somerville, M.P. Greaves, Eds. Taylor & Francis, 45–60.
- (27) Kato, Yasuhiro. (1998). Mechanism of pesticide transformation in the environment: Aerobic and bio-transformation of pesticides in aqueous environment. *Proceedings of the 16th Symposium on Environmental Science of Pesticide*, 105–120.
- (28) Keuken O., Anderson J.P.E. (1996). Influence of storage on biochemical processes in soil. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 59–63 (SETAC-Europe).
- (29) Stenberg B., Johansson M., Pell M., Sjö Dahl-Svensson K., Stenström J., Torstensson L. (1996). Effect of freeze and cold storage of soil on microbial activities and biomass. In *Pesticides, Soil Microbiology and Soil Quality*, 68–69 (SETAC-Europe).
- (30) Gennari, M., Negre, M., Ambrosoli, R. (1987). Effects of ethylene oxide on soil microbial content and some chemical characteristics. *Plant and Soil* 102, 197–200.
- (31) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diallat im Boden. *Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII*, 141–146.
- (32) Hamaker, J.W. (1976). The application of mathematical modelling to the soil persistence and accumulation of pesticides. *Proc. BCPC Symposium: Persistence of Insecticides and Herbicides*, 181–199.
- (33) Goring, C.A.I., Laskowski, D.A., Hamaker, J.W., Meikle, R.W. (1975). Principles of pesticide degradation in soil. In „*Environmental Dynamics of Pesticides*”. R. Haque and V.H. Freed, Eds., 135–172.
- (34) Timme, G., Frehse, H., Laska, V. (1986). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. II. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer* 39, 188–204.
- (35) Timme, G., Frehse, H. (1980). Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues. I. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer* 33, 47–60.
- (36) Gustafson D.I., Holden L.R. (1990). Non-linear pesticide dissipation in soil; a new model based on spatial variability. *Environm. Sci. Technol.* 24, 1032–1041.
- (37) Hurl K., Walker A. (1980). Persistence and its prediction. In *Interactions between Herbicides and the Soil* (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 83–122.

1. melléklet

Vízszívó erő, szántóföldi vízkapacitás (FC) és víztartó képesség (WHC)⁸

A vízoszlop magassága [cm]	pF ^(a)	bar ^(b)	Megjegyzések
10 ⁷	7	10 ⁴	Száraz talaj Hervadáspon
1,6 × 10 ⁴	4,2	16	
10 ⁴	4	10	
10 ³	3	1	
6 × 10 ²	2,8	0,6	
3,3 × 10 ²	2,5	0,33 (°)	
10 ²	2	0,1	
60	1,8	0,06	Szántóföldi vízkapacitás tartomány (°)
33	1,5	0,033	
10	1	0,01	
1	0	0,001	WHC (közelítés) Vízrel telített talaj

(a) pF = a vízoszlopmagasság cm-ben kifejezett értékének logaritmusa.

(b) 1 bar = 10⁵ Pa.

(c) Homokban körülbelül 10%-os, vályogban körülbelül 35%-os, agyagban pedig körülbelül 45%-os víztartalomnak felel meg.

(d) A szántóföldi vízkapacitás nem állandó, hanem talajtípusként eltérő, és pF 1,5 és 2,5 között változik.

A vízszívó erőt vízszlop-cm vagy bar mértékegységben mérjük. A szívóerő nagysága igen széles tartományban mozoghat, ezért egyszerűen csak pF-értékként adjuk meg, amely a vízszlop-cm érték logaritmus.

A szántóföldi vízkapacitás azt a vízmennyiséget jelenti, amelyet egy természetes talaj egy hosszabb esőzés vagy kellő mértékű öntözés után 2 nappal gravitáció ellenében tárolni tud. A szántóföldi vízkapacitást érintetlen talajban, *in situ*, a terepen határozzák meg. A mérés tehát nem alkalmazható megbolygatott, laboratóriumi talajmintákra. A megbolygatott mintákban meghatározott FC-értékek nagyobb szisztematikus varianciát mutathatnak.

A víztartó képességet (WHC) laboratóriumban határozzák meg érintetlen és megbolygatott talajokban úgy, hogy egy talajoszlopot kapilláris transzport útján vízzel telítenek. Különösen jól alkalmazható megbolygatott talajok esetében, és akár 30%-kal is meghaladhatja a szántóföldi vízkapacitást (1). Emellett egyszerűbben meghatározható kísérletileg, mint a megbízható FC-értékek.

⁸ Mückenhausen, E. (1975). Die Bodenkunde und ihre geologischen, geomorphologischen, mineralogischen und petrologischen Grundlagen. DLG-Verlag, Frankfurt, Main.

2. melléklet

**Különböző országokból származó különböző talajtípusok nedvességtartalma
(g víz/100 g száraz talaj)**

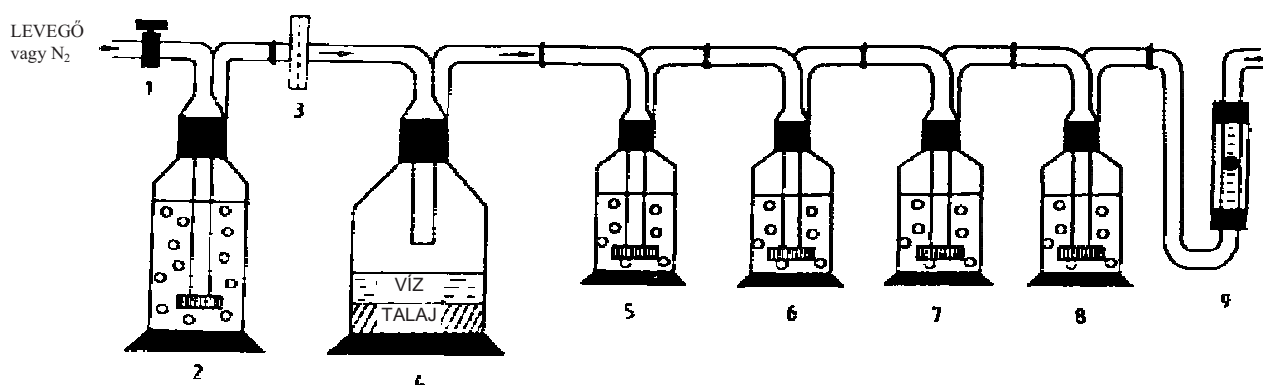
Talajtípus	Ország	Talajnedvesség		
		WHC ⁽¹⁾	pF = 1,8	pF = 2,5
Homok	Németország	28,7	8,8	3,9
Vályogos homok	Németország	50,4	17,9	12,1
Vályogos homok	Svájc	44,0	35,3	9,2
Iszapos vályog	Svájc	72,8	56,6	28,4
Agyagos vályog	Brazília	69,7	38,4	27,3
Agyagos vályog	Japán	74,4	57,8	31,4
Homokos vályog	Japán	82,4	59,2	36,0
Iszapos vályog	USA	47,2	33,2	18,8
Homokos vályog	USA	40,4	25,2	13,3
⁽¹⁾ Víztartó képesség				

3. melléklet

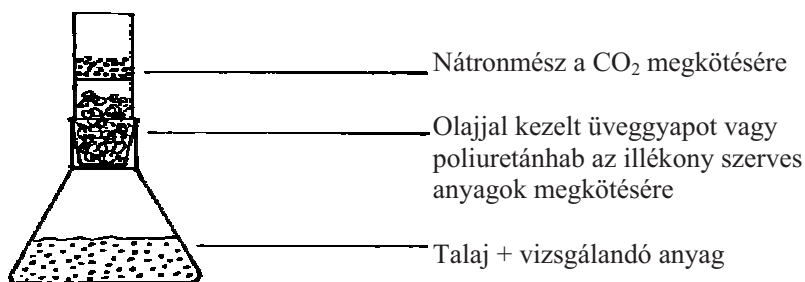
1. ábra

Példa vegyi anyagok talajbeli átalakulásának vizsgálatára szolgáló átfolyósos készülékre (1) (2)

- | | | |
|--|--|--|
| 1: tűszelep | 4: talajanyagcsere-palack (vizes elárasztás csak anaerob vagy rizsföldi mérési körülmények esetén) | 6: kénsavcsapda a lúgos illékony vegyületekhez |
| 2: vizet tartalmazó gázmosó üveg | 5: etilén-glikol csapda az illékony szerves vegyületekhez | 7, 8: nátrium-hidroxid csapda a CO ₂ -höz és más savas illékony vegyületekhez |
| 3: ultramembrán (csak steril körülmények esetén), pórusméret: 0,2 µm | | 9: áramlásmérő. |



2. ábra

Példa vegyi anyagok talajbeli átalakulásának vizsgálatára szolgáló biométer-típusú lombikra (3)

(1) Guth, J.A. (1980). The study of transformations. In Interactions between Herbicides and the Soil (R.J. Hance, Ed.), Academic Press, 123–157.

(2) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry. D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds. J. Wiley & Sons. Vol 1, 85–114.

(3) Anderson, J.P.E. (1975). Einfluss von Temperatur und Feuchte auf Verdampfung, Abbau und Festlegung von Diklallat im Boden. Z. PflKrankh Pflschutz, Sonderheft VII, 141–146.

C.24. AEROB ÉS ANAEROB ÁTALAKÍTÁS VÍZI ÜLEDÉKRENDSZEREKBE

1. MÓDSZER

Ez a vizsgálati módszer az OECD TG 308 (2002) módszer megfelelője.

1.1. Bevezetés

A sekély és mély felszíni vizekbe a vegyi anyagok juthatnak be például a következő útvonalakon keresztül: közvetlen alkalmazás, permetszéthordás, felszíni elfolyás, belvízelvezetés, hulladéklerakás, ipari, háztartási vagy mezőgazdasági szennyvizek és légköri kiülepedés. Ez a vizsgálati módszer egy olyan laboratóriumi módszert ismertet, amellyel szerves anyagok aerob és anaerob átalakulását vizsgálhatjuk vízi üledékrendszerekben. Ez a módszer meglévő irányelveken alapul (1) (2) (3) (4) (5) (6). Az 1995-ben az olaszországi Belgirateban megrendezett, a talajok/üledékek kiválasztásával kapcsolatos OECD-munkaértekezleten (7) megegyezés született az e vizsgálatban alkalmazandó üledékek számáról és típusáról. A munkaértekezlet egy ISO Útmutató (8) alapján ajánlásokat fogalmazott meg az üledékminták gyűjtéséről, kezeléséről és tárolásáról is. Az ilyen vizsgálatokra olyan vegyi anyagok esetében van szükség, amelyek közvetlenül a vizekbe kerülnek, vagy amelyek a fenti útvonalakon át valószínűleg bekerülnek a vízi környezetbe.

A természetes vízi üledékrendszerekben a felső vízfázis gyakran aerob. Az üledék felszíni rétege lehet aerob vagy anaerob is, a mélyebb üledék viszont általában anaerob. Ez a dokumentum aerob és anaerob vizsgálatokat is ismertet annak érdekében, hogy a fenti lehetőségek mindegyikét felölelje. Az aerob vizsgálat egy aerob üledékréteg felett elhelyezkedő aerob vízoszlopot szimulál, ahol az aerob üledékréteget alulról egy anaerob gradiens határolja. Az anaerob vizsgálat egy teljesen anaerob víz-üledék rendszert szimulál. Ha a körülmények arra utalnak, hogy jelentős mértékben el kell térni az itt megfogalmazott ajánlásoktól, például amiatt, hogy ép üledékmagokat vagy olyan üledékeket használunk, amelyek esetleg érintkezésbe léphettek a vizsgálandó anyaggal, akkor a célra más módszerek is rendelkezésre állnak (9).

1.2. Fogalom meghatározások

Minden esetben SI (Standard International) egységeket kell használni.

»Vizsgálandó anyag«: bármely anyag, legyen az a kiindulási vegyület, vagy megfelelő átalakulási termék.

»Átalakulási termékek«: minden olyan anyag, amely a vizsgálandó anyag biotikus és abiotikus átalakulási reakcióiban keletkezik, ideértve a CO₂-t és minden kötött maradványt is.

»Kötött maradványok«: a talajban, növényekben vagy állatokban jelen lévő olyan vegyületek, amelyek a kiindulási anyag vagy anyagcseretermék(i) formájában extrakció után is a mátrixban maradnak. Az extrakciós módszer alapján véve nem változtathatja meg magukat a vegyületeket vagy a mátrix szerkezetét. A kötés jellege részben mátrixmódosító extrakciós módszerek, illetve kifinomult analitikai technikák segítségével tisztázható. Ez idáig kovalens, ionos és szorpciós kötések, valamint zárványokat azonosítottak ilyen módon. A kötött maradványok létrejötte általában szignifikánsan csökkenti a biológiai elérhetőséget és biológiai hozzáférhetőséget (10) [az IUPAC 1984-ben módosította (11)].

»Aerob átalakulás«: (oxidáló): molekuláris oxigén jelenlétében végbemenő reakciók (12).

»Anaerob átalakulás«: (redukáló): molekuláris oxigén kizárásával végbemenő reakciók (12).

»Természetes vizek«: tavakból, folyókból, patakokból stb. származó felszíni vizek.

»Üledék«: ásványi és szerves kémiai komponensek keveréke, amelyek közül az utóbbiak magas szén- és nitrogéntartalmú és nagy molekulásúlyú vegyületek. A természetes vizekből ülepednek ki és azzal határfelületet képeznek.

»Mineralizáció«: a szerves vegyületek teljes mértékű lebomlása aerob körülmények között CO₂-vé és H₂O-vá, illetve anaerob körülmények között CH₄-gyé, CO₂-vé és H₂O-vá. E vizsgálati módszer vonatkozásában radioaktívan jelölt vegyületek alkalmazásakor a mineralizáció egy molekula nagyfokú lebomlását jelenti, amelynek során egy jelölt szénatom kvantitatívan oxidálódik vagy redukálódik, és az ennek megfelelő mennyiségű ¹⁴CO₂, illetve ¹⁴CH₄ szabadul fel.

»Felezési idő«: t_{0,5}, a vizsgálandó anyag 50%-ának átalakulásához szükséges idő, ha az átalakulás elsődrendű kinetikával írható le; a felezési idő független a kiindulási koncentrációtól.

»DT₅₀ (lebomlási idő 50)«: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag kiindulási koncentrációja 50%-kal csökken.

»DT₇₅ (lebomlási idő 75)«: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag kiindulási koncentrációja 75%-kal csökken.

»DT₉₀ (lebomlási idő 90)«: az az időtartam, amely alatt a vizsgálandó anyag kiindulási koncentrációja 90%-kal csökken.

1.3. Referenciaanyagok

Az átalakulási termékek spektroszkópiás és kromatográfiás módszerekkel történő azonosításához és/vagy mennyiségi méréséhez referenciaanyagokat kell alkalmazni.

1.4. A vizsgálandó anyaggal kapcsolatos információk

Az átalakulás sebességének mérésére nem jelölt vagy izotóppal jelölt vizsgálandó anyagot is alkalmazhatunk, bár előnyben kell részesíteni a jelölt anyagokat. Jelölt anyagra olyankor van szükség, ha az átalakulási útvonalakat kívánjuk tanulmányozni vagy anyagmérleget akarunk felvenni. A ^{14}C jelölés az ajánlott, de más izotópok, így például ^{13}C , ^{15}N , ^3H vagy ^{32}P is alkalmazható. A jelölést lehetőleg a molekula legstabilabb részén vagy részein kell elhelyezni⁹. A vizsgálandó anyag kémiai és/vagy radiokémiai tisztaságának legalább 95%-nak kell lennie.

A vizsgálat elvégzése előtt az alábbi információkkal kell rendelkezni a vizsgálandó anyagról:

- a) oldhatóság vízben (A6. módszer);
- b) oldhatóság szerves oldószerekben;
- c) gőznyomás (A4. módszer) és Henry-állandó;
- d) n-oktanol/víz megoszlási hányados (A8. módszer);
- e) adszorpciós koefficiens (adott esetben K_d , K_f vagy K_{oc}) (C18. módszer);
- f) hidrolízis (C7. módszer);
- g) disszociációs állandó (pK_a) [112. számú OECD Útmutató] (13);
- h) vizsgálandó anyag kémiai szerkezete és adott esetben az izotópjelölés(ek) elhelyezkedése.

Megjegyzés: A jelentésben azt is fel kell tüntetni, hogy a méréseket milyen hőmérsékleten végeztük.

További hasznos információk lehetnek a vizsgálandó anyag mikroorganizmusokra gyakorolt toxicitásával kapcsolatos információk, a gyors és/vagy inherens biológiai lebonthatósággal kapcsolatos adatok, valamint a talajbeli aerob és anaerob átalakulással összefüggő adatok.

Rendelkezésre kell hogy álljanak a vizsgálandó anyagoknak és átalakulási termékeiknek vízben és üledékben történő mennyiségi és minőségi meghatározására szolgáló analitikai módszerek (ezen belül az extrakciós és edényzettisztítási módszerek) (lásd az 1.7.2. szakaszt).

1.5. A vizsgálati módszer elve

Az itt ismertetett módszer egy aerob és egy anaerob vízi üledékrendszert (lásd az 1. mellékletet) alkalmaz, amely lehetővé teszi, hogy:

- (i) mérjük a vizsgálandó anyag átalakulásának sebességét a víz-üledék rendszerben,
- (ii) mérjük a vizsgálandó anyag átalakulásának sebességét az üledékben,
- (iii) mérjük a vizsgálandó anyag és/vagy átalakulási termékei mineralizációjának sebességét (ha ^{14}C -jelölt vizsgálandó anyagot alkalmazunk),
- (iv) azonosítsuk és mennyiségileg is meghatározzuk az átalakulási termékeket a víz- és az üledékfázisban, és ezen belül anyagmérleget is készítsünk (ha jelölt vizsgálandó anyagot alkalmazunk),
- (v) sötétben (például az algavirágzást elkerülendő) és állandó hőmérsékleten történő inkubálással mérjük a vizsgálandó anyag és átalakulási termékei megoszlását a két fázis között. Ha az adatok indokolják, meg kell határozni a felezési időt, valamint a DT_{50} -, DT_{75} - és DT_{90} -értékeket is, de a kísérleti időszakot jóval meghaladó időtartamokra nem szabad extrapolálni (lásd az 1.2. szakaszt).

Legalább két-két üledékre és a hozzájuk kapcsolódó vizekre van szükség az aerob, illetve az anaerob vizsgálatokhoz (7). Lehetnek azonban olyan esetek is, amikor több mint kétféle vízi üledéket kell használni, így például olyan vegyi anyag esetében, amely édesvizekben és/vagy tengeri környezetben is megjelenhet.

1.6. A vizsgálat alkalmazhatósága

A módszer bármilyen kémiai anyaghoz alkalmazható (legyen az nem jelölt vagy jelölt anyag), amelyhez létezik kielégítően pontos és érzékeny analitikai módszer. Enyhén illékony, nem illékony, vízben oldható és vízben kevésbé oldható vegyületekre is alkalmazható. A vizsgálat nem alkalmazható olyan vegyületekre, amelyek a vízben nagymértékben illékonyak (pl. gázalakú növényvédő szerek, szerves oldószerek), és ezért nem lehet őket a vizsgálat kísérleti körülményei között a vízben és/vagy az üledékben tartani.

A módszerrel az eddigiekben vegyi anyagok édesvizekben és üledékeikben történő átalakulását vizsgálták, de elvben torkolati/tengeri rendszerekhez is alkalmazható. Nem alkalmas azonban folyóvízi vagy nyílttengeri körülmények szimulálására.

⁹ Ha például a vizsgálandó anyag egy gyűrűt tartalmaz, akkor ezt a gyűrűt kell megjelölni. Ha a vizsgálandó anyag két vagy több gyűrűt is tartalmaz, esetleg külön vizsgálatot kell végezni az egyes jelölt gyűrűk sorsának megismeréséhez, illetve az átalakulási termékek keletkezésével kapcsolatos információk összegyűjtéséhez.

1.7. Minőségi követelmények

1.7.1. Kinyerési fok

A vizsgálandó anyag hozzáadása után azonnal legalább két párhuzamos víz- vagy üledékminta extraktumát elemezve kaphatjuk az analitikai módszer ismételhetőségével és a vizsgálandó anyag alkalmazására szolgáló eljárás egységességével kapcsolatos első információkat. A kísérletek későbbi szakaszában a kinyerési fokokat a vonatkozó anyagmérlegek adják (ha jelölt anyagot alkalmazunk). Jelölt vegyi anyagok esetén 90% és 110% közé (6), nem jelölt vegyi anyagok esetén pedig 70% és 110% közé kell esnie a kinyerési foknak.

1.7.2. Az analitikai módszer ismételhetősége és érzékenysége

A vizsgálandó anyag és átalakulási termékei mennyiségi meghatározására használt analitikai módszer ismételhetőségét az átalakulási termékek megjelenéséhez elegendő ideig végzett inkubálás után a vízből vagy üledékből egy extrahálással nyert kivonat két párhuzamos mérésével ellenőrizhetjük (a kezdeti extrakciós hatásfok kivételével).

Az adott vizsgálandó anyagra és átalakulási termékeire az analitikai módszer kimutatási határának (limit of detection, LOD) vízben vagy üledékben legalább $0,01 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1}$ -nak (mint vizsgálandó anyag), vagy – ha az a kisebb – egy vizsgálati rendszerben alkalmazott kiindulási mennyiség 1%-ának kell lennie. Meg kell állapítani emellett a mennyiségi meghatározás határát (limit of qualification, LOQ) is.

1.7.3. Az átalakulási adatok pontossága

Ha a vizsgálandó anyag koncentrációjának időfüggvényét regressziós analízisnek vetjük alá, akkor megfelelő információkat kaphatunk az átalakulási görbe pontosságáról, és lehetővé válik a konfidenciahatárok kiszámítása a felezési időkhöz (pszeudo-elsőrendű kinetika esetén) vagy a DT_{50} -értékekhez, illetve adott esetben a DT_{75} - és DT_{90} -értékekhez is.

1.8. A módszer ismertetése

1.8.1. Vizsgálati rendszer és készülék

A vizsgálatot üvegedényekben (pl. palackokban és centrifugacsövekben) kell végezni, kivéve, ha az előzetes információk (így például az n-oktanol/víz megoszlási hányados, a szorpciós adatok stb.) szerint a vizsgálandó anyag megtapadhat az üvegfelületen, ilyenkor esetleg fontolóra kell venni más szerkezeti anyag (így például teflon) alkalmazását. Az alábbi módszerek alkalmazásával enyhíthetjük a problémát, ha ismert, hogy a vizsgálandó anyag megtapad az üvegfelületen:

- meghatározzuk az üvegfelülethez kötődő vizsgálandó anyag és átalakulási termékek tömegét;
- a vizsgálat végén minden üvegedényt oldószerrel mosunk;
- formulázott terméket alkalmazunk (lásd még az 1.9.2. szakaszt);
- a vizsgálandó anyagot nagyobb mennyiségű társoldószerrel együtt vezetjük be a vizsgálati rendszerbe; csak olyan társoldószer szabad használni, amely nem oldja a vizsgálandó anyagot.

A tipikus vizsgálati készülékekre, azaz a gázátfolyós és a biométer-típusú rendszerre a 2., illetve 3. mellékletben láthatunk példákat (14). További alkalmazható inkubáló rendszereket ismertet a (15) hivatkozás. A kísérleti berendezést úgy kell kialakítani, hogy lehetővé tegye a lég- vagy nitrogéncserét és az illékony termékek befogását. A berendezés méreteit pedig úgy kell megválasztani, hogy teljesüljenek a vizsgálatra vonatkozó követelmények (lásd az 1.9.1. szakaszt). A ventilációt vagy óvatos buborékolatással, vagy a vízfelszín feletti levegő- vagy nitrogénbefújással kell biztosítani. Ez utóbbi esetben ajánlatos lehet a vizet felülről óvatosan kevertetni, hogy az oxigén vagy a nitrogén egyenletesebben oszoljon szét a vízben. Nem szabad CO_2 -mentes levegőt használni, mivel az a víz pH-jának növekedését eredményezheti. Az üledék perturbációja egyik esetben sem kívánatos, és lehetőség szerint minél inkább kerülni kell. Az enyhén illékony vegyi anyagokat biométer-típusú rendszerben kell vizsgálni a vízfelszín óvatos kevertetése mellett. Alkalmazható továbbá légköri levegős vagy nitrogénes gáztérrel rendelkező zárt rendszer is, amely az illékony termékek elnyelésére belső fiolákat tartalmaz (16). Aerob vizsgálatok esetében rendszeresen cserélni kell a gáztérben lévő levegőt, hogy kompenzálni lehessen a biomassza oxigénfogyasztását.

Az illékony átalakulási termékek gyűjtésére alkalmas elnyelető folyadékok többek között a következők: a szén-dioxidhoz $1 \text{ mol} \times \text{dm}^{-3}$ koncentrációjú kálium-hidroxid vagy nátrium-hidroxid oldat¹⁰, szerves vegyületekhez pedig az etilén-glikol, az etanolamin vagy 2%-os xilolos paraffinoldat. Az anaerob körülmények között képződő illékony vegyületek, mint a metán, például molekulaszitákkal köthetők meg. További lehetőség, hogy az ilyen illékony vegyületeket CuO-dal töltött kvarcsövön átvezetve 900°C hőmérsékleten CO_2 -vé oxidáljuk, és a képződött CO_2 -ot lúgos abszorberben fogjuk fel (17).

¹⁰ Mivel az ilyen lúgos elnyelető oldatok a szellőztetőlevegőben lévő, illetve az aerob kísérletekben a légzés nyomán képződő szén-dioxidot is megkötik, rendszeres időközönként cserélni kell őket, hogy meg lehessen előzni a telítődésüket és abszorpciós kapacitásuk ezzel járó csökkenését.

A vizsgálandó anyag és az átalakulási termékek elemzéséhez különféle laboratóriumi műszerek szükségesek [pl. gáz-folyadék kromatográf (GLC), nagy teljesítményű folyadékkromatográf (HPLC), vékonyréteg kromatográf (TLC), tömegspektrométer (MS), gázkromatográf/tömegspektrométer (GC-MS), folyadékkromatográf/tömegspektrométer (LC-MS), magmágeneses rezonancia berendezés (NMR) stb.], a radioaktívan jelölt vagy nem jelölt anyagokhoz alkalmas detektorrendszerrel. Ha radioaktívan jelölt anyagot alkalmazunk folyadékszintillációs számlálóra és oxidáló égőtökamrára is szükség van (az üledékmintáknak a radioaktivitás-mérés előtti elégetéséhez).

A fizikai, kémiai és biológiai mérésekhez (lásd az 1.8.2.2. szakasz 1. táblázatát) további szokványos laboratóriumi eszközök, illetve esetenként további üvegeszközök, vegyszerek és reagensek is szükségesek.

1.8.2. A vízi üledékminták kiválasztása és száma

A mintavételi helyeket minden esetben a vizsgálat céljával összhangban kell kiválasztani. A mintavételi helyek kiválasztásakor figyelembe kell venni a korábbi mezőgazdasági, ipari vagy háztartási tevékenységek vízgyűjtőre és a felvizekre gyakorolt hatását is. Nem szabad olyan üledékeket alkalmazni, amelyek az előző 4 évben a vizsgálandó anyaggal vagy szerkezeti analógaival szennyeződtek.

1.8.2.1. Az üledék kiválasztása

Az aerob vizsgálatokhoz általában kétféle üledéket kell alkalmazni (7), amelyeknek szerves széntartalom és szerkezet szempontjából el kell térniük egymástól. Az egyik üledéknek legyen magas (2,5–7,5%) szervesszén-tartalma, és legyen finomszerkezetű, a másiknak pedig legyen alacsony (0,5–2,5%) a szervesszén-tartalma, és legyen durvaszerkezetű. A szerveszén-tartalom különbségének általában legalább 2%-nak kell lennie. A »finomszerkezet« > 50% [agyag + iszap]¹¹ tartalmat, a »durvaszerkezet« pedig < 50% [agyag + iszap] tartalmat jelent. A két üledék [agyag + iszap] tartalma különbségének általában legalább 20% kell lennie. Olyan esetekben, amikor a vegyi anyag sós vizekbe is eljuthat, legalább az egyik mintaként tengeri eredetű víz-üledék rendszert kell használni.

A szigorúan anaerob vizsgálatban a két üledéket (és kapcsolódó vizeiket) a felszíni víztestek anaerob zónáiból kell venni (7). Mind az üledék-, mind pedig a vízfázist óvatosan és az oxigén kizárása mellett kell kezelni és szállítani.

Az üledékek kiválasztásakor más paraméterek is fontosak lehetnek, amelyeket minden esetben egyedileg kell fontolórra venni. Például az üledékek pH-tartománya is fontos lehet az olyan vegyi anyagok vizsgálata szempontjából, amelyeknek átalakulása és/vagy szorpciója pH-függő. A szorpció pH-függését jellemezheti a vizsgálandó anyag pK_a -értéke is.

1.8.2.2. A víz-üledék minták jellemzése

Az 1. táblázat összefoglalja a víz és az üledék legfontosabb mérendő és (az alkalmazott módszerre való hivatkozással együtt) rögzítendő paramétereit, valamint azt, hogy ezeket a paramétereket a vizsgálatok melyik fázisában kell meghatározni. Tájékoztatásul: alkalmas elemzési módszerek találhatók a (18), a (19), a (20) és a (21) hivatkozásban.

Esetenként még további paramétereket is mérni és jelenteni kell [pl. édesvizek esetében: lebegőanyag, lúgosság, vízkeménység, vezetőképesség, NO_3/PO_4 (arány és egyedi értékek); az üledékek esetében: kationcserélő kapacitás, víztartó képesség, karbonáttartalom, összes nitrogén és foszfor; valamint tengeri rendszerekben a sótartalom]. Különösen az anaerob átalakulás szempontjából hasznos lehet még a redoxkörülmenyek értékeléséhez a víz és az üledék nitrát-, szulfát-, biológiailag hozzáférhető vas- és esetleges egyéb elektronakceptor-tartalmának meghatározása is.

¹¹ Az [agyag + iszap] az üledék < 50 µm részecskeméretű ásványi frakciója.

A víz-üledék minták jellemzésére szolgáló paraméterek mérése (7) (22) (23)

Paraméter	A vizsgálati eljárás szakaszai					
	mintagyűjtés	minta kezelés után	aklimatizáció kezdete	vizsgálat kezdete	vizsgálat közbeni szakaszai	vizsgálat vége
<i>Víz</i>						
Eredet/forrás	X					
Hőmérséklet	X					
pH	X		X	X	X	X
TOC			X	X		X
O ₂ -koncentráció	X		X	X	X	X
Redoxpotenciál*			X	X	X	X
<i>Üledék</i>						
Eredet/forrás	X					

Paraméter	A vizsgálati eljárás szakaszai					
	mintagyűjtés	minta kezelés után	akklimatizáció kezdete	vizsgálat kezdete	vizsgálat közbülső szakaszai	vizsgálat vége
A réteg mélysége	X					
pH		X	X	X	X	X
Szemcseméret-eloszlás		X				
TOC		X	X	X		X
Mikrobális biomassza**		X		X		X
Redoxpotenciál*	Érzékszervi (szín/szag)		X	X	X	X

* A legfrissebb kutatási eredmények igazolták, hogy a víz oxigénkoncentrációjának és redoxpotenciáljának mérése nem rendelkezik sem mechanisztikus, sem prediktív értékkel a felszíni vizek mikrobapopulációinak növekedése és fejlődése szempontjából (24) (25). Az aerob biológiai átalakulási sebességek és útvonalak értelmezését és értékelését jobban segíti a biológiai oxigénigény (BOI, a mintavételkor, illetve a vizsgálat kezdetén és végén), a mikro- és makrotápanyagok, a Ca, a Mg és a Mn (a vizsgálat kezdetén és végén) vízben, illetve az összes N és az összes P (a mintavételkor és a vizsgálat végén) üledékben történő meghatározása.

** Az aerob vizsgálatokhoz mikroba légzési ráta módszer (26), gázzal történő fertőtlenítési módszer (27) vagy mikroszkópos számlálás (pl. baktériumok, sugárgombák, gombák és teljes kolóniák); az anaerob vizsgálatokhoz metánképződési sebesség.

1.8.3. Mintavétel, kezelés és tárolás

1.8.3.1. Mintavétel

Az üledékekből történő mintavételhez a fenéküledékek mintavételéről szóló ISO útmutató-tervezetet (8) kell használni. Az üledék teljes 5–10 cm-es felső rétegéből üledékmintákat kell venni. Az ehhez társított vizet ugyanarról a helyről kell venni, és ugyanabban az időben, mint az üledéket. Az anaerob vizsgálatokhoz az üledék és víz mintavételét, valamint szállítását oxigén kizárása mellett kell végezni (28) (lásd az 1.8.2.1. szakaszt). Egyes mintavevő eszközöket a (8) és a (23) hivatkozás ismerteti.

1.8.3.2. Kezelés

Az üledéket 2 mm-es szitán végzett nedves szűrővel választjuk el a víztől, nagy feleslegben alkalmazva azonos helyről származó, helyileg elvezetett vizet. Ezt követően inkubáló lombikban ismert mennyiségű üledéket és vizet a kívánt arányban egymáshoz keverünk (lásd az 1.9.1. szakaszt), és előkészítjük az akklimatizálódási periódusra (lásd az 1.8.4. szakaszt). Az anaerob vizsgálatokhoz a kezelés minden lépését oxigén kizárása mellett kell végezni (29) (30) (31) (32) (33).

1.8.3.3. Tárolás

A frissen gyűjtött üledék és víz alkalmazása a legelőnyösebb, de ha tárolás szükséges, akkor az üledéket és a vizet a fentiek szerint le kell szűrni, majd sötétben, 4 ± 2 °C-on, vízzel elárasztva (6–10 cm-es vízréteg) kell együtt tárolni őket, legfeljebb 4 hétig (7) (8) (23). Az aerob vizsgálatokhoz alkalmazott mintákat szabad levegőbeáramlás mellett kell tárolni (pl. nyitott edényekben), az anaerob vizsgálatok esetében viszont oxigén kizárásával. Vigyázni kell arra, hogy a szállítás és tárolás során az üledék és a víz ne fagyjon ki, illetve az üledék ne száradjon ki.

1.8.4. Az üledék/víz minták előkészítése a vizsgálatokhoz

A vizsgálandó anyag hozzáadása előtt akklimatizációs időszakot kell hagyni, amelyhez minden üledék/víz mintát a fő vizsgálatokhoz használt inkubáló edénybe kell tenni, és az akklimatizáció idején pontosan ugyanazokat a körülményeket kell fenntartani, mint a fő vizsgálatban (lásd az 1.9.1. szakaszt). Az akklimatizációs időszak ahhoz szükséges, hogy a rendszer a pH, a víz oxigénkoncentrációja, az üledék és a víz redoxpotenciálja és a fázisok makroszkopikus elkülönülése tekintetében viszonylag stabilá váljon. Az akklimatizáció időtartama általában egy-két hét, de semmiképpen sem haladhatja meg a négy hetet. Az ebben a szakaszban végzett mérések eredményeit is fel kell tüntetni a jelentésben.

1.9. A vizsgálat elvégzése

1.9.1. Kísérleti körülmények

A vizsgálatot az inkubáló berendezésben kell végezni (lásd az 1.8.1. szakaszt) úgy, hogy a víz és az üledék térfogatának aránya 3:1 és 4:1 között legyen, az üledék vastagsága pedig 2,5 cm ($\pm 0,5$ cm)¹². Javasolt az egyes inkubáló edényekben minimum 50 g üledéket (szárazsúly) tenni.

¹² A legutóbbi kutatások szerint a 4 °C-on való tárolás az üledék szervesszén-tartalmának csökkenését okozhatja, ami esetleg a mikrobális aktivitás csökkenéséhez vezethet (34).

A vizsgálatot sötétben, 10 °C és 30 °C közötti állandó hőmérsékleten kell végezni. A legmegfelelőbb a (20 ± 2) °C. Egyes esetekben, a vizsgálatról várt információk függvényében fontolóra lehet venni, hogy a méréseket más, alacsonyabb hőmérsékleten (pl. 10 °C-on) is elvégezzék. Az inkubálási hőmérsékletet folyamatosan ellenőrizni kell, és a jelenlésben is fel kell tüntetni.

1.9.2. A vizsgálandó anyag kezelése és alkalmazása

A vizsgálatához egyféle koncentrációban kell használni a vegyi anyagot¹³. A közvetlenül a vizekbe jutott növényvédő szerek esetében a címkén lévő maximális adagolást kell a vizsgálati edényben lévő víz felszíne alapján kiszámolt maximális alkalmazási rátának venni. Minden más esetben a környezeti kibocsátásokon alapuló előrejelzések alapján kell kiválasztani az alkalmazandó koncentrációt. Ügyelni kell arra, hogy a vizsgálandó anyagot olyan koncentrációban alkalmazzuk, amely lehetővé teszi az átalakulási útvonal jellemzését, valamint az átalakulási termékek képződésének és fogyasztásának mérését. Olyan esetekben, amikor a vizsgálandó anyag koncentrációja a vizsgálat kezdetén közel van a kimutatási határhoz és/vagy a vizsgálandó anyag alkalmazási rátájának 10%-át kitevő mennyiségben jelen lévő fő átalakulási termékeket nem lehet könnyen kimutatni, akkor magasabb (pl. 10-szeres) dózisok alkalmazására lehet szükség. Ha azonban magasabb tesztkoncentrációkat alkalmazunk, ellenőrizni kell, hogy nem gyakorolnak-e jelentős káros hatásokat a víz-üledék rendszer mikrobiális aktivitására. Ahhoz, hogy a vizsgálandó anyag állandó koncentrációban legyen jelen a különféle méretű edényekben, indokoltnak tűnhet az alkalmazott anyagmennyiség megfelelő beállítása az alapján, hogy hogyan aránylik egymáshoz az edénybeli és a terepi vízoszlopmélység (amely utóbbit 100 cm-nek feltételezzük, de ettől eltérő mélységek is alkalmazhatók). Ilyen számításra lásd a 4. mellékletben található példa.

A vizsgálandó anyagot ideálisan vizes oldat formájában kell a vizsgálati rendszer vízfázisába juttatni. Ha elkerülhetetlen, akkor a vizsgálandó anyag bejuttatására és elosztatására a vizsgálati rendszerben kis mennyiségben felhasználhatunk vízzel elegyedő oldószereket is (például acetont, etanolt), de az oldószerek mennyisége nem haladhatja meg az 1 térfogatszázalékot, és nem lehetnek káros hatásai a vizsgálati rendszer mikrobiális aktivitására. A vizsgálandó anyag vizes oldatának előállításakor is gondosan kell eljárni, és a teljes homogenitás érdekében oldatkészítő oszlopot vagy előkeverést is lehet alkalmazni. Érdemes a vizes fázist óvatosan megkeverni, miután a vizes oldatot a rendszerbe juttattuk, vigyázva arra, hogy az üledéket a lehető legkevesbé keverjük fel.

Formulázott termékek alkalmazása általában nem ajánlott, mivel a készítmény összetevői befolyásolhatják a vizsgálandó anyag és/vagy az átalakulási termékek megoszlását a víz- és az üledékfázis között. A vízben rosszul oldódó vizsgálandó anyagok esetében azonban megfelelő alternatíva lehet a formulázott anyag alkalmazása.

Az inkubáló edények száma a mintavétel gyakoriságától függ (lásd az 1.9.3. szakaszt). Megfelelő számú vizsgálati rendszert kell alkalmazni ahhoz, hogy minden mintavételhez két-két rendszert tudjunk felhasználni. Ha minden egyes vízi üledékrendszerhez van kontrollegység, ezeket nem szabad a vizsgálandó anyaggal kezelni. A kontrollegységeket arra használhatjuk, hogy a vizsgálat végén meghatározzuk az üledék mikrobás biomasszáját, illetve a víz és az üledék teljes szerveszén-tartalmát. A kontrollegységek közül kettőt (mindkét víziüledék-mintához egyet-egyet) arra használhatunk fel, hogy az akklimatizációs időszakban nyomon kövessük az üledékben és a vízben a megfelelő paramétereket (lásd az 1.8.2.2. szakasz táblázatát). Ha a vizsgálandó anyagot oldószernel juttatjuk be a rendszerbe, akkor még további két kontrollegységre van szükség, hogy mérni tudjuk az oldószernél a vizsgálati rendszer mikrobiális aktivitására gyakorolt káros hatásait is.

1.9.3. A vizsgálat időtartama és a mintavétel

A kísérlet időtartama általában nem lehet több 100 napnál (6). Akkor fejezhető be, amikor elegendő eredmény van a bomlási útvonal és a víz/üledék megoszlás lefutásának megállapítására, vagy amikor a vizsgálandó anyag 90%-a az átalakulás és/vagy az elpárolgás miatt elfogy a rendszerből. A vizsgálat kezdetét is beleszámítva legalább hat alkalommal kell mintákat venni, ez kiegészíthető a megfelelő mintavételi rend és vizsgálati időtartam meghatározására szolgáló, opcionális előzetes vizsgálattal (lásd az 1.9.4. szakaszt), ha korábbi vizsgálatok alapján nem áll rendelkezésre elegendő adat a vizsgálandó anyagról. Hidrofób anyagok esetében a vizsgálat kezdeti szakaszában esetleg további mintavételi időpontok beiktatására is szükség lehet a víz- és üledékfázis közötti megoszlási hányados meghatározásához.

A megfelelő mintavételi időpontokban komplett inkubáló edényeket veszünk ki a vizsgálatokhoz, (mindig kettőt a párhuzamos mérésekhez). Az üledéket és felette lévő vizet külön-külön analizáljuk¹⁴. A felszíni vizet óvatosan kell eltávolítani, vigyázva arra, hogy eközben ne keverjük fel az üledéket. A vizsgálandó anyag és az átalakulási termékek kivonását és jellemzését megfelelő analitikai eljárásokkal kell elvégezni. Gondoskodni kell arról, hogy eltávolítsuk az esetlegesen az inkubáló edény falán vagy az illékony anyagok befogására használt elnyelőtök összekötő vezetékén megtapadt anyagokat is.

¹³ Ha az alacsonyabb koncentrációkat kellő pontossággal lehet mérni, hasznos lehet a vizsgálat elvégzése egy másik koncentrációértékkal is az olyan vegyi anyagok esetén, amelyek többféle útvonalon is bejuthatnak a felszíni vizekbe, ezért szignifikánsan eltérő koncentrációban jelenhetnek meg.

¹⁴ Azokban az esetekben, ha az anaerob átalakulási termékek könnyen és gyorsan újraoxidálódhatnak, az anaerob körülményeket a mintavétel és a vizsgálatok időtartama alatt is fenn kell tartani.

1.9.4. Opcionális előzetes vizsgálat

Ha a vizsgálat időtartamát és a mintavételi rendet nem lehet meghatározni a vizsgálandó anyaggal kapcsolatos más vizsgálatok eredményei alapján, célszerű lehet opcionális előzetes vizsgálatot végezni a végleges vizsgálatához javasolttal egyező körülmények között. A jelentésben a megfelelő kísérleti körülményeket és az előzetes vizsgálatok eredményeit is össze kell foglalni.

1.9.5. Mérések és elemzések

Minden egyes mintavételi időpontban meg kell határozni, és fel kell jegyezni a vizsgálandó anyag és az átalakulási termékek koncentrációját mind a vízben, mind az üledékben (abszolút koncentráció és az alkalmazott mennyiséghez viszonyított százalékos arány). Általában minden olyan átalakulási terméket azonosítani kell, amely bármelyik mintavételi időpontban a teljes víz-üledék rendszerben alkalmazott radioaktivitás 10%-át reprezentáló mennyiségben detektálható, kivéve, ha ennek elhagyása megfelelően megindokolható. Meg kell fontolni a fenti küszöbérték alatt maradó, de vizsgálat során folyamatosan növekvő mennyiségű átalakulási termékek azonosítását is, mert ezeknél tartós fennmaradásra utalhatnak az eredmények. Az esetleges perzisztenciát mindig egyedileg kell értékelni és a jelentésben megfelelően indokolni.

A gáz/illékony komponens elnyelő rendszerben mért eredményeket (CO_2 és egyéb anyagok, pl. illékony szerves vegyületek) is minden mintavételi időpontra fel kell tüntetni a jelentésben. Szerepeltetni kell a mineralizációs rátákat. Meg kell adni az üledékben lévő nem extrahálható (kötött) maradványokat is minden mintavételi pontra.

2. ADATOK

2.1. Az eredmények kezelése

Mindegyik mintavételre ki kell számítani a hozzáadott radioaktivitás teljes mérlegét vagy kinyerési fokát (lásd az 1.7.1. szakaszt). Az eredményeket a hozzáadott radioaktivitás százalékában kell kifejezni. A radioaktivitásnak a víz és az üledék közötti megoszlását koncentrációértékként és százalékos arányként is meg kell adni minden mintavételi időpontban.

Ki kell számolni a vizsgálandó anyag felezési idejét, DT_{50} -értékét, valamint adott esetben DT_{75} - és DT_{90} -értékét is a konfidenciahatárokkal együtt (lásd az 1.7.3. szakaszt). Információt lehet kapni a vizsgálandó anyag vízre és üledékre vonatkoztatott kiürülési sebességéről is a megfelelő kiértékelő módszerek segítségével. Ilyen módszerek például a pszeudo-elsőrendű kinetikák alkalmazása, a grafikus vagy numerikus megoldásokat alkalmazó empirikus görbeillesztési technikák, illetve a még komplexebb eljárások, amelyek például egy- vagy több-kompartimentos modelleket alkalmaznak. Ezzel kapcsolatos további részletek a szakirodalomban találhatók (35) (36) (37).

Minden megközelítésnek megvannak a maga előnyei és hátrányai és komplexitásuk tekintetében is igen sokfélék lehetnek. Az elsőrendű kinetika feltételezése a bomlási és megoszlási folyamatok túlzott leegyszerűsítését jelentheti, de amikor lehetséges, könnyen érthető és mind a szimulációs modellek, mind a becsült környezeti koncentrációk számítása szempontjából értékes eredményt (sebességi állandó vagy felezési idő) szolgáltat. Az empirikus módszerek vagy a lineáris transzformációk jobb görbeillesztést eredményezhetnek, így pontosabban lehet becsülni a felezési időket, a DT_{50} -értékeket, valamint adott esetben a DT_{75} - és a DT_{90} -értékeket is. A kapott állandók alkalmazhatósága azonban korlátozott. A kompartmentumos (környezeti elemeket alkalmazó) modellekkel egy sor hasznos állandót kaphatunk, amelyek a kockázatfelmérések szempontjából értékesek, mivel leírják a vegyi anyag különböző környezeti elemekben végbemenő degradációját és megoszlási arányait is, továbbá felhasználhatók a fő átalakulási termékek képződéséhez és lebomlásához tartozó sebességi állandók becslésére is. A módszer kiválasztását minden esetben megfelelően indokolni kell, és a kísérletezőnek grafikusán és/vagy statisztikailag igazolnia kell az illesztés jóságát.

3. JELENTÉS

3.1. Vizsgálati jelentés

A vizsgálati jelentésnek a következőket kell tartalmaznia:

vizsgálandó anyag:

– hétköznapi név, kémiai elnevezés, CAS-szám, szerkezeti képlet [radioaktívan jelölt anyagok alkalmazása esetén a jelölés(ek) elhelyezkedése] és a lényeges fizikai-kémiai tulajdonságok (lásd az 1.5. szakaszt);

- a vizsgálandó anyag tisztasága (szennyezései);
- a jelölt vegyi anyagok radiokémiai tisztasága és moláris aktivitása (adott esetben).

Referenciaanyagok:

- az átalakulási termék jellemzésére és/vagy azonosítására alkalmazott referenciaanyagok kémiai elnevezése és szerkezete.

A vizsgálatához használt üledékek és vizek:

- a vízi üledékminták vételének mintavételi helye(i) és ez(ek) ismertetése, ezen belül lehetőleg a korábbi szennyezések története;
- a víz-üledék rendszerek gyűjtésével, esetleges tárolásával és akklimatizációjával kapcsolatos összes információ;
- a víz-üledék minták tulajdonságai, az 1.8.2.2. szakasz táblázatában foglaltak szerint.

Kísérleti körülmények:

- az alkalmazott vizsgálati rendszerek (pl. átfolyósos, biométer, a szellőzés módja, a keverési módszer, a víz térfogata, a víz- és az üledékréteg vastagsága, a tesztedény méretei stb.);
- a vizsgálandó anyag bejuttatása a vizsgálati rendszerbe: a vizsgálatban alkalmazott koncentrációk, a párhuzamos és kontrollmérések száma, a vizsgálandó anyag alkalmazásának módja (pl. oldószer használata) stb.;
- inkubálási hőmérséklet;
- a mintavételek időpontjai;
- extrakciós módszerek és hatékonyságuk, valamint az analitikai módszerek és kimutatási határok;
- az átalakulási termékek jellemzésére/azonosítására alkalmazott módszerek;
- a kísérleti protokolltól vagy vizsgálati feltételektől való eltérések a vizsgálat folyamán.

Eredmények:

- reprezentatív elemzések nyers adatai (minden nyers adatot a GLP-archívumban kell tárolni);
- az alkalmazott analitikai módszerek ismételhetősége és érzékenysége;
- kinyerési fokok (az érvényes vizsgálat százaléktételeit az 1.7.1. szakasz adja meg);
- az alkalmazott kiindulási dózis százalékában és $\text{mg} \times \text{kg}^{-1}$ egységekben kifejezett, az üledékre, vízre és teljes rendszerre vonatkoztatott (utóbbira csak százalékos) eredmények táblázatos összefoglalása a vizsgálandó anyagra, valamint adott esetben az átalakulási termékekre és a nem extrahálható radioaktivitásra is;
- anyagmérleg a vizsgálatok közben és végén;
- a vízfrakcióban, az üledékfrakcióban és a teljes rendszerben végbemenő átalakulás (ezen belül mineralizáció) grafikus megjelenítése;
- mineralizációs sebességek;
- felezési idő, DT_{50} (esetenként DT_{75} és DT_{90} is) a vizsgálandó anyagra és adott esetben annak fő átalakulási termékeire az üledékben, vízben és a teljes rendszerben, a konfidenciahatárok feltüntetésével;
- a vizsgálandó anyag és adott esetben fő átalakulási termékeinek átalakulási kinetikájának becslése;
- adott esetben az átalakítás feltételezett útvonalai;
- az eredmények diszkussziója.

4. HIVATKOZÁSOK

(1) BBA-Guidelines for the examination of plant protectors in the registration process. (1990). Part IV, Section 5–1: Degradability and fate of plant protectors in the water/sediment system. Germany.

(2) Commission for registration of pesticides: Application for registration of a pesticide. (1991). Part G. Behaviour of the product and its metabolites in soil, water and air, Section G.2.1 (a). The Netherlands.

(3) MAFF Pesticides Safety Directorate. (1992). Preliminary guideline for the conduct of biodegradability tests on pesticides in natural sediment/water systems. Ref No SC 9046. United-Kingdom.

(4) Agriculture Canada: Environmental chemistry and fate. (1987). Guidelines for registration of pesticides in Canada. Aquatic (Laboratory) – Anaerobic and aerobic. Canada. pp 35–37.

(5) US-EPA: Pesticide assessment guidelines, Subdivision N. Chemistry: Environmental fate (1982). Section 162–3, Anaerobic aquatic metabolism.

(6) SETAC-Europe publication. (1995). Procedures for assessing the environmental fate and ecotoxicity of pesticides. Ed. Dr. Mark R. Lynch. SETAC-Europe, Brussels.

- (7) OECD Test Guidelines Programme. (1995). Final Report of the OECD Workshop on Selection of Soils/sediments, Belgrate, Italy, 18–20 January 1995.
- (8) ISO/DIS 5667–12. (1994). Water quality – Sampling – Part 12: Guidance on sampling of bottom sediments.
- (9) US-EPA (1998a). Sediment/water microcosm biodegradation test. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3180). EPA 712-C-98-080.
- (10) DFG: Pesticide Bound Residues in Soil. Wiley-VCH (1998).
- (11) T.R. Roberts: Non-extractable pesticide residues in soils and plants. Pure Appl. Chem. 56, 945–956 (IUPAC 1984).
- (12) OECD Test Guideline 304A: Inherent Biodegradability in Soil (adopted 12 May 1981).
- (13) OECD (1993): Guidelines for Testing of Chemicals. Paris. OECD (1994–2000): Addenda 6–11 to Guidelines for the Testing of Chemicals.
- (14) Scholz, K., Fritz R., Anderson C. and Spiteller M. (1988) Degradation of pesticides in an aquatic model ecosystem. BCPC – Pests and Diseases, 3B–4, 149–158.
- (15) Guth, J.A. (1981). Experimental approaches to studying the fate of pesticides in soil. In Progress in Pesticide Biochemistry (D.H. Hutson, T.R. Roberts, Eds.), Vol. 1, 85–114. J. Wiley & Sons.
- (16) Madsen, T., Kristensen, P. (1997). Effects of bacterial inoculation and non-ionic surfactants on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. Environ. Toxicol. Chem. 16, 631–637.
- (17) Steber, J., Wierich, P. (1987). The anaerobic degradation of detergent range fatty alcohol ethoxylates. Studies with ^{14}C -labelled model surfactants. Water Research 21, 661–667.
- (18) Black, C.A. (1965). Methods of Soil Analysis. Agronomy Monograph No. 9. American Society of Agronomy, Madison.
- (19) APHA (1989). Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (17th edition). American Public Health Association, American Water Works Association and Water Pollution Control Federation, Washington D.C.
- (20) Rowell, D.L. (1994). Soil Science Methods and Applications. Longman.
- (21) Light, T.S. (1972). Standard solution for redox potential measurements. Anal. Chemistry 44, 1038–1039.
- (22) SETAC-Europe publication (1991). Guidance document on testing procedures for pesticides in freshwater mesocosms. From the Workshop ‘A Meeting of Experts on Guidelines for Static Field Mesocosms Tests’, 3–4 July 1991.
- (23) SETAC-Europe publication. (1993). Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. From the Workshop On Sediment Toxicity Assessment (WOSTA), 8–10 November 1993. Eds.: I.R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach.
- (24) Vink, J.P.M., van der Zee, S.E.A.T.M. (1997). Pesticide biotransformation in surface waters: multivariate analyses of environmental factors at field sites. Water Research 31, 2858–2868.
- (25) Vink, J.P.M., Schraa, G., van der Zee, S.E.A.T.M. (1999). Nutrient effects on microbial transformation of pesticides in nitrifying waters. Environ. Toxicol. 329–338.
- (26) Anderson, T.H., Domsch, K.H. (1985). Maintenance carbon requirements of actively-metabolising microbial populations under *in-situ* conditions. Soil Biol. Biochem. 17, 197–203.
- (27) ISO–14240–2. (1997). Soil quality – Determination of soil microbial biomass – Part 2: Fumigation- extraction method.
- (28) Beelen, P. Van and F. Van Keulen. (1990), The Kinetics of the Degradation of Chloroform and Benzene in Anaerobic Sediment from the River Rhine. Hydrobiol. Bull. 24 (1), 13–21.
- (29) Shelton, D.R. and Tiedje, J.M. (1984). General method for determining anaerobic biodegradation potential. App. Environ. Microbiol. 47, 850–857.
- (30) Birch, R.R., Biver, C., Campagna, R., Gledhill, W.E., Pagga, U., Steber, J., Reust, H. and Bontinck, W.J. (1989). Screening of chemicals for anaerobic biodegradation. Chemosphere 19, 1527–1550.
- (31) Pagga, U. and Beimborn, D.B. (1993). Anaerobic biodegradation tests for organic compounds. Chemosphere 27, 1499–1509.
- (32) Nuck, B.A. and Federle, T.W. (1986). A batch test for assessing the mineralisation of ^{14}C -radiolabelled compounds under realistic anaerobic conditions. Environ. Sci. Technol. 30, 3597–3603.
- (33) US-EPA (1998b). Anaerobic biodegradability of organic chemicals. Harmonised Test Guidelines (OPPTS 835.3400). EPA 712-C-98-090.

- (34) Sijm, Haller and Schrap (1997). Influence of storage on sediment characteristics and drying sediment on sorption coefficients of organic contaminants. *Bulletin Environ. Contam. Toxicol.* 58, 961–968.
- (35) Timme, G., Frehse H. and Laska V. (1986) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues II. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 39, 187–203.
- (36) Timme, G., Frehse, H. (1980) Statistical interpretation and graphic representation of the degradational behaviour of pesticide residues I. *Pflanzenschutz – Nachrichten Bayer*, 33, 47–60.
- (37) Carlton, R.R. and Allen, R. (1994). The use of a compartment model for evaluating the fate of pesticides in sediment/water systems. *Brighton Crop Protection Conference – Pest and Diseases*, pp 1349–1354.

1. melléklet

Útmutató az aerob és anaerob vizsgálati rendszerekhez

Aerob vizsgálati rendszer

Az ebben a módszerben ismertetett aerob vizsgálati rendszer egy aerob vízrétegből (a tipikus oxigénkoncentráció 7 és $10 \text{ mg} \times \text{l}^{-1}$ közötti) és egy üledékrétegből áll, amelynek felszíni része aerob, felszín alatti része pedig anaerob (az üledék anaerob zónájában a tipikus átlagos redoxpotenciál (Eh) -80 és -190 mV között változik). A víz felszíne felett nedvesített levegőt vezetnek át minden inkubációs egységen, hogy kellő oxigénszintet tartsanak a gáztérben.

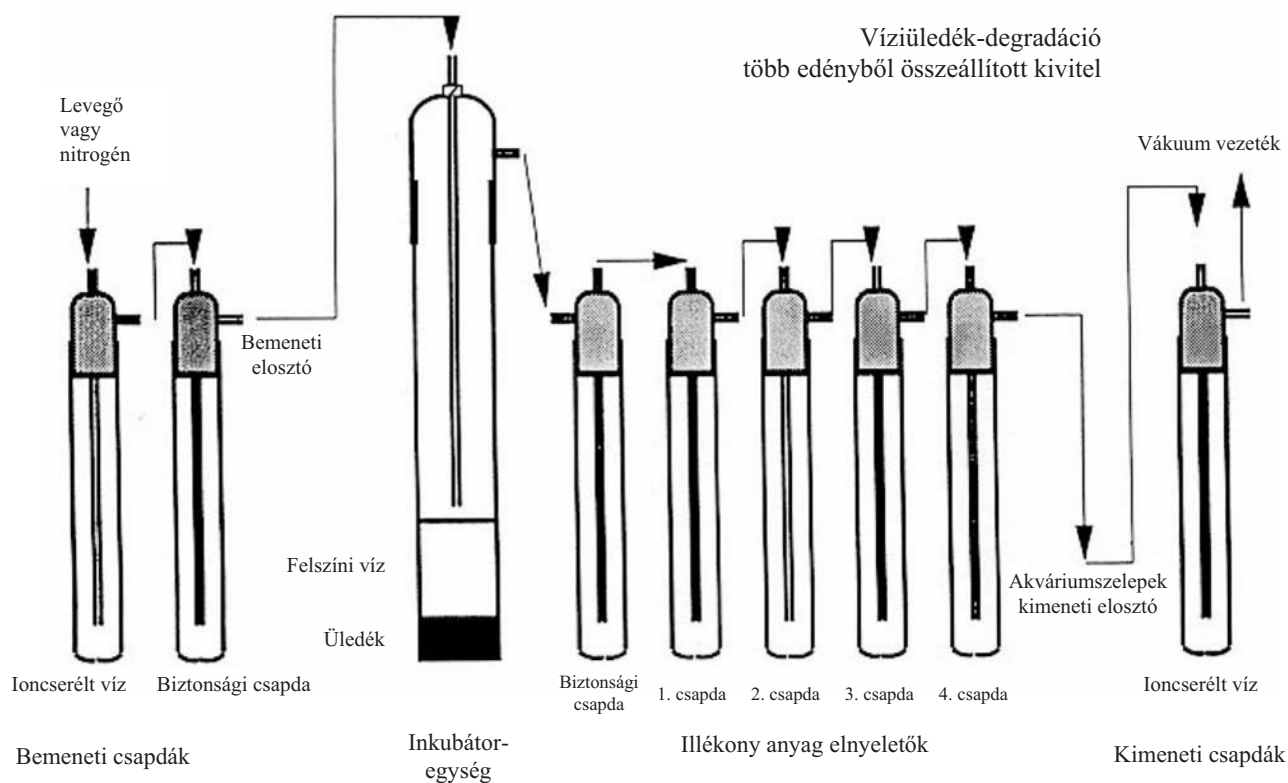
Anaerob vizsgálati rendszer

Az anaerob vizsgálati rendszernél a vizsgálati eljárás lényegében megegyezik az anaerob rendszernél vázolttal, azzal a különbséggel, hogy itt minden inkubációs egységen nedvesített nitrogént vezetnek át a víz felszíne felett, hogy nitrogéngázteret tartsanak fenn. Ha a redoxpotenciál (Eh) -100 mV -nál alacsonyabb, akkor az üledék és a víz is anaerobnak tekinthető.

Az anaerob vizsgálatban, a mineralizáció vizsgálata magában foglalja a képződött széndioxid és metán mérését is.

2. melléklet

Példa egy gázátvezetési készülékre

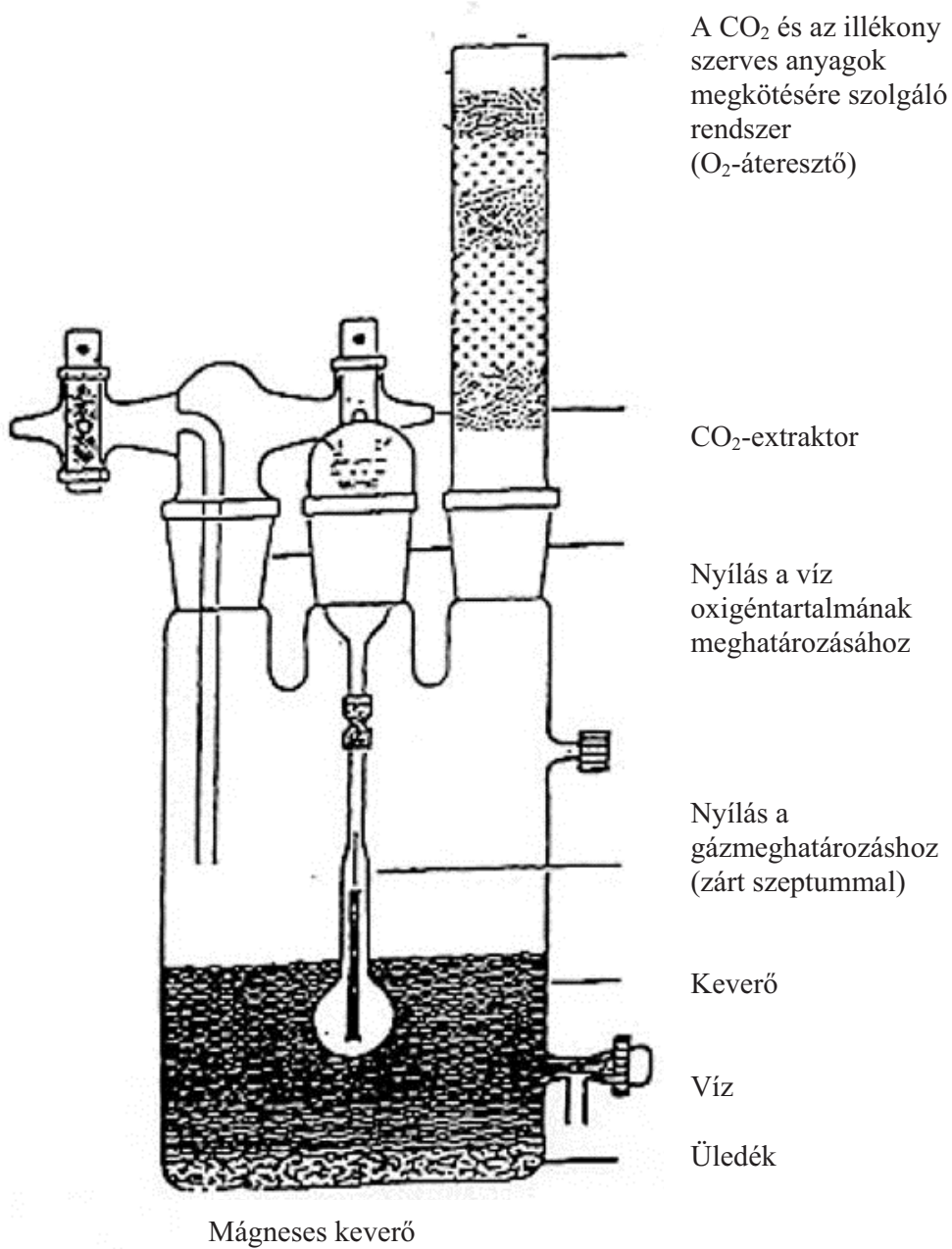


Biztonsági csapda, üres

1. csapda: etilén-glikol az illékony szerves anyagok megkötésére
2. csapda: 0,1 m kénsav a lúgos illékony anyagok megkötésére
3. és 4. csapda: 2 m nátrium-hidroxid a CO_2 és más savas illékony anyagok megkötésére

3. melléklet

Példa egy biométer készülékre



4. melléklet

Mintaszámítás a tesztedényben alkalmazandó dózishoz

A henger belső átmérője: = 8 cm

Vízoszlopmélység az üledék nélkül: = 12 cm

Vízfelszín nagysága: $3,142 \times 4^2 = 50,3 \text{ cm}^2$

Alkalmazási arány: 500 g vizsgálandó anyag/ha $5 \mu \text{ g/cm}^2$ -nek felel meg

Teljes μg : $5 \times 50,3 = 251,5 \mu\text{g}$

A mennyiség korrigálása a 100 cm-es mélységre: $12 \times 251,5 : 100 = 30,18 \mu\text{g}$

A vízoszlop térfogata: $50,3 \times 12 = 603 \text{ ml}$

Koncentráció a vízben: $30,18 : 603 = 0,050 \mu\text{g/ml}$ vagy $50 \mu\text{g/l}$

ELŐFIZETÉSI FELHÍVÁS

Kormányrendelet felhatalmazása alapján jelenteti meg a Miniszterelnöki Hivatal a Magyar Közlöny mellékleteként a **HIVATALOS ÉRTESÍTŐT**. A lap hetente, szerdánként, tematikus főrészekben hitelesen közli a legfőbb állami, önkormányzati, társadalmi, gazdasági szervek, illetve szervezetek személyi, szervezeti, igazgatási és képzési, valamint a hírközlési tevékenység (frekvenciagazdálkodás, távközlés, postaügy, informatika) közleményeit, továbbá az üzleti élet híreit. Térítési díj ellenében közzé tesszük a Kincstári Vagyoni Igazgatóság vagyonértékesítési pályázatait, az állami, társadalmi, gazdasági szervezetek, parlamenti pártok, kamarák, helyi önkormányzatok, egyházak, különböző képviseletek közleményeit. Fizetett hirdetésként – akár színes oldalakon is – helyet kaphatnak az Értesítőben a gazdálkodó szervezetek, egyetemek, alapítványok, de magánszemélyek közérdeklődésre számot tartó közlései is.

Őszintén reméljük, hogy a hírek, információk, közlemények egy lapban történő pontos és rendszerezett formában való közreadásával sikerül hatékonyabbá és eredményesebbé tenni előfizetőink tájékozódását a hivatali és üzleti életben. Az érdeklődők számára egyéb hasznos információkat is nyújt a lap.

Az Európai Unió Hivatalos Lapja 2004. május 1-jétől az Európai Unió hivatalos nyelveként magyarul is megjelenik. A hivatalos lap L és C sorozatból áll.

Az L (Legislation) sorozatban kerülnek kiadásra az Európai Unió hatályos jogszabályai, az ún. elsődleges jogforrások (alapító szerződések, csatlakozási szerződések, társulási szerződések), továbbá az alábbi jogforrások: *rendeletek, irányelvek, határozatok*.

Az EU Hivatalos Lapjában történő közzétételt követően az évfolyam és a kötet számára, valamint a megjelenés dátumára hivatkozással, cím szerint, 2004. május 1-jétől folyamatosan tájékoztatást adunk a hivatalos lap L kiadásában megjelenő jogi aktusokról a Magyar Közlöny mellékleteként megjelenő **Hivatalos Értesítőben**.

A lap előfizetésben megrendelhető a Magyar Hivatalos Közlönykiadó 1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6. címén, levélcím: 1394 Budapest 62., Pf. 357; faxszám: 318-6668.

2006. évi éves előfizetési díja: 13 356 Ft áfával.

A **HIVATALOS ÉRTESÍTŐ** egyes számai megvásárolhatók a kiadó közlőnyboltjában (1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6. telefon/fax: 267-2780) vagy a Közlöny Centrumban (1072 Budapest, Rákóczi út 30., bejárat a Dohány u. és Nyár u. sarkán, telefon: 321-5971, fax: 321-5275).

M E G R E N D E L Ő L A P

Megrendelem a **HIVATALOS ÉRTESÍTŐ** című lapot példányban, és kérem a következő címre kézbesíteni:

Megrendelő neve:

címe (város/község, irányítószám):

utca, házszám:

Ügyintéző (telefonszám):

2006. évi előfizetési díj fél évre 6678 Ft áfával ☐

egy évre 13 356 Ft áfával ☐

Számlát kérek a befizetéshez. ☐

Kérjük, a négyzetbe történő X bejelöléssel jelezze az előfizetés időtartamát.

Kelt.:

.....
cégszerű aláírás

ELŐFIZETÉSI FELHÍVÁS

A jogalkotásról szóló 1987. évi XI. törvény rendelkezik – többek között – a Magyar Köztársaság Kormánya hivatalos lapjának, a **Határozatok Tárá**nak megjelentetéséről.

A Határozatok Tárát szerkeszti a Miniszterelnöki Hivatal a Szerkesztőbizottság közreműködésével, évente mintegy 60 alkalommal jelenik meg.

A Határozatok Tára a Kormánynak azokat a határozatait (kétezres) közli, amelyeknek közzétételét a Kormány elrendelte, továbbá tartalmazza a miniszterelnök határozatait, a Miniszterelnöki Hivatal vezető miniszter határozatait, valamint a minisztériumok, az országos hatáskörű szervek, az önkormányzatok közleményeit, hirdetményeit, különféle tájékoztatóit, továbbá azokat a közleményeket stb., amelyeket a Miniszterelnöki Hivatal vezető miniszter engedélyez.

A Határozatok Tára megrendelhető a Magyar Hivatalos Közlönykiadó címén (Budapest VIII., Somogyi Béla u. 6.; postacím: 1394 Budapest 62, Pf. 357) vagy a 318-6668 faxszámán.

Éves előfizetési díja 2006. évre: 20 664 Ft áfával.

Példányonként megvásárolható a kiadó közlönyboltjában (1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6., tel./fax: 267-2780) vagy a Közlöny Centrumban (1072 Budapest, Rákóczi út 30., bejárat a Dohány u. és Nyár u. sarkán, tel.: 321-5971, fax: 321-5275).

MEGRENDELŐLAP

Megrendelem a

HATÁROZATOK TÁRA

című lapot példányban.

A megrendelő (cég) neve:

Címe (város, irányítószám):

Utca, házszám:

Az ügyintéző neve, telefonszáma:

A megrendelő (cég) bankszámlaszáma:

2006. évi előfizetési díj egy évre: 20 664 Ft áfával. ☐

fél évre: 10 332 Ft áfával. ☐

Csekket kérek a befizetéshez ☐

Kérjük, a négyzetbe történő X bejelöléssel jelezze az előfizetés időtartamát!

A megrendelt példányok ellenértékét a postaköltséggel együtt, a szállítást követő számla kézhezvétele után, 8 napon belül a Magyar Hivatalos Közlönykiadónak a számlán feltüntetett pénzforgalmi jelzőszámára átutaljuk.

Keltezés:

.....
cégszerű aláírás

ELŐFIZETÉSI FELHÍVÁS

A Miniszterelnöki Hivatal és a Belügyminisztérium közös szerkesztésében havonta megjelenő

ÖNKORMÁNYZATOK KÖZLÖNYE

az önkormányzatok számára működésük során hasznos és nélkülözhetetlen tájékoztatói forrás.

A kiadvány első három része az önkormányzatokat érintő, újonnan kihirdetett jogszabályokat (törvények, rendeletek – ideértve az önkormányzati rendeleteket is –, alkotmánybírósági és egyéb határozatok) közli. Negyedik főrésze közleményeket, pályázati felhívásokat és tájékoztatásokat (szakértők közleményei, az Állami Számvevőszék ajánlásai, az önkormányzatok által elnyerhető támogatások pályázati feltételei, az önkormányzatok éves pénzügyi beszámolóit, alapító okiratok stb.) tartalmaz.

Az **Önkormányzatok Közlönye** előfizetésben megrendelhető a Magyar Hivatalos Közlönykiadó (1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6.) címén (postacím: 1394 Budapest 62. Pf. 357) vagy a 318-6668 faxszámán.

2006. évi éves előfizetés díja: 5040 Ft áfával; féléves előfizetés: 2620 Ft áfával.

Példányonként megvásárolható a kiadó közlönypultjában (1085 Budapest, Somogyi Béla u. 6., tel./fax: 267-2780) vagy a Közlöny Centrumban (1072 Budapest, Rákóczi út 30., bejárat a Dohány u. és Nyár u. sarkán, tel.: 321-5971, fax: 321-5275).

MEGRENDELŐLAP

Megrendeljük az **Önkormányzatok Közlönye** című lapot példányban.

A megrendelő (cég) neve:

Címe (város, irányítószám):

Utca, házszám:

Az ügyintéző neve, telefonszáma:

A megrendelő (cég) bankszámlaszáma:

A megrendelt példányok ellenértékét a postaköltséggel együtt, a szállítást követő számla kézhezvétele után, 8 napon belül a Magyar Hivatalos Közlönykiadónak a számlán feltüntetett pénzforgalmi jelzőszámára átutaljuk.

Keltezés:

.....
cégszerű aláírás



Szerkeszti a Miniszterelnöki Hivatal, a Szerkesztőbizottság közreműködésével.

A Szerkesztőbizottság elnöke: dr. Pulay Gyula. A szerkesztésért felelős: dr. Müller György. Budapest V., Kossuth tér 1–3.

Kiadja a Magyar Hivatalos Közlönykiadó. Felelős kiadó: dr. Kodela László elnök-vezérigazgató.

Budapest VIII., Somogyi Béla u. 6. Telefon: 266-9290.

Előfizetésben megrendelhető a Magyar Hivatalos Közlönykiadónál

Budapest VIII., Somogyi Béla u. 6., 1394 Budapest 62. Pf. 357, vagy faxon 318-6668.

Előfizetésben terjeszti a Magyar Hivatalos Közlönykiadó a FÁMA Rt. közreműködésével. Telefon/fax: 266-6567.

Információ: tel.: 317-9999, 266-9290/245, 357 mellék.

Példányonként megvásárolható a kiadó Budapest VIII., Somogyi B. u. 6. (tel./fax: 267-2780) szám alatti közlönypoltjában vagy a Budapest VII., Rákóczi út 30. (bejárat a Dohány u. és Nyár u. sarkán) szám alatti Közlöny Centrumban (tel.: 321-5971, fax: 321-5275), illetve megrendelhető a www.mhk.hu/kozlonybolt internetcímen.

2005. évi éves előfizetési díj: 89 148 Ft. Egy példány ára: 184 Ft 16 oldal terjedelemig, utána +8 oldalanként +161 Ft.

A kiadó az előfizetési díj évközbeni emelésének jogát fenntartja.

HU ISSN 0076—2407

05.3294 – Nyomja a Magyar Hivatalos Közlönykiadó Lajosmizsei Nyomdája. Felelős vezető: Burján Norbert vezérigazgató-helyettes.